



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



INSTITUTO DE INVESTIGACION IDIPAZ

ESTUDIO CLÍNICO-EXPERIMENTAL DE NUEVOS COMPONENTES DE DISFUNCIÓN NEUROCRISTAL EN LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA

Ana Lourdes Luis Huertas. Tesis Doctoral

ESTUDIO CLÍNICO-EXPERIMENTAL DE NUEVOS COMPONENTES DE DISFUNCIÓN NEUROCRISTAL EN LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA

TESIS DOCTORAL

ANA LOURDES LUIS HUERTAS

DIRECTORES

**Dr Prof Juan Antonio Tovar Larrucea
Dr Leopoldo Martínez Martínez**

Madrid, 2013

DECLARACION DE LOS DIRECTORES

D Juan Antonio Tovar Larrucea, Catedrático de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Departamento de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario La Paz, y

D Leopoldo Martínez Martínez, Profesor Asociado de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid y Médico Adjunto del Departamento de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario La Paz, declaran:

QUE el trabajo “Estudio clínico-experimental de nuevos componentes de disfunción neurocristal en la hernia diafragmática congénita” presentado por la Licenciada en Medicina D^a Ana Lourdes Luis Huertas para optar al título de Doctor, ha sido realizado íntegramente en nuestro Departamento y bajo nuestra dirección.

QUE representa un meritorio esfuerzo para indagar las posibles causas de disfunción neurocristal y de secuelas relacionadas en los pacientes con esta patología.

QUE ha sido realizado con objetivos claramente establecidos, metodología científica adecuada y rigor en la evaluación de los resultados obtenidos, así como con claridad expositiva.

QUE se trata de una aportación de valor científico indudable que reúne todos los requisitos para ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Lo que hacemos constar en Madrid a 29 de Agosto de 2013.

Prof Dr Juan Antonio Tovar Larrucea

Dr Leopoldo Martínez Martínez

Este estudio ha sido realizado en el Laboratorio de Malformaciones Congénitas y en el Departamento de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil La Paz, con ayuda de una beca de investigación de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP) y de una ayuda para la investigación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III (FIS 09/1943).

A Carolina y Daniel

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar mostrando mi agradecimiento a los directores de esta Tesis Doctoral:

a Juan Tovar, por quien siento gran respeto y admiración profesional y personal, y quien, como jefe del Departamento de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil La Paz, me transmitió las enseñanzas y consejos que sentaron en mí las bases quirúrgicas de nuestra especialidad. También por su trato, siempre afectuoso, y por sus valores morales, con los que siempre me he sentido identificada.

Fue para mí un privilegio compartir con él mi etapa de residencia, respaldada y garantizada por su indiscutible trayectoria y experiencia profesional, avalada internacionalmente.

Le estaré siempre agradecida por su interés en mi formación, no sólo en el ámbito quirúrgico; sino también y con la misma importancia, en los aspectos académicos y en el campo de la investigación, que marcaron en mí una forma especial y característica de entender la Cirugía Pediátrica, y la Medicina en general. Le agradezco por supuesto, su iniciativa, empuje y apoyo para la realización de este trabajo; y su interés y confianza en mí para que lo llevase a cabo desde el primer momento.

A Leopoldo Martínez, a quien también tuve la suerte de conocer en mis primeros contactos con la Cirugía Pediátrica, y con quien desde estos inicios me sentí cercana; y de quien siempre valoraré su gran capacidad de trabajo y ascendente carrera, a pesar de su juventud.

Por transmitirme siempre y de forma motivante el lado atractivo de las cosas, por demostrarme que todo es posible y que no hay tiempo para el desánimo, aun en las situaciones más adversas. En definitiva: por enseñarme a hacer fácil lo más difícil.

Quiero darle las gracias por su inestimable ayuda y entrega en la elaboración de este trabajo.

Continúo con mi reconocimiento al Comité Evaluador de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), que otorgó la beca de investigación a este proyecto, ofreciendo el soporte económico necesario para su elaboración.

Por supuesto, a todos los pacientes que participaron en este estudio y a sus familiares, por su desinteresada y perfecta colaboración. Ellos hicieron este trabajo posible, y ellos forman parte de él.

A todos los profesionales del Hospital Universitario La Paz que han participado técnicamente en este proyecto: personal de Enfermería, técnicos de Laboratorios, de Anatomía Patológica, de Radiología y de Medicina Nuclear. A los compañeros del Laboratorio de Malformaciones Congénitas del Instituto de Investigación, en el que se realizaron todas las labores experimentales de este trabajo. Un recuerdo especial a Federica Pederiva, por sus enseñanzas en mi inicio en las tareas de laboratorio, tanto en la manipulación de los animales, como en el manejo e interpretación de las técnicas inmunohistoquímicas; y mi reconocimiento a su gran capacidad de trabajo, que tanto me sirvió en los comienzos de este proyecto.

A los compañeros del CSIC, que colaboraron en la realización de las exploraciones radiológicas de Resonancia Magnética: por su gran disponibilidad y facilitación de todas las tareas técnicas.

A los compañeros del Hospital La Paz que me han supervisado y aconsejado en la valoración e interpretación de los estudios histológicos (Dr. Rodríguez), analíticos (Dr. Buño), densitométricos (Dr. Coya), inmunológicos (Dr. Ferreira) y de Nefrología (Dra. Fernández).

A Isabel González, que creó “huecos” de tiempo donde no existían, para proporcionarme información y supervisión en los conceptos de la Endocrinología Pediátrica.

A Montse Bret y Emilio Cuesta, que mostraron su interés en la participación en este proyecto desde los primeros momentos, incluso desde la etapa de diseño del mismo. Por su inestimable ayuda en la interpretación de los estudios radiológicos, por transmitir y compartir sus conocimientos en esta disciplina, y por su actitud siempre alentadora y desinteresada en este trabajo. A Montse también, por esos momentos de confidencias y por su comprensión en todo momento.

No quiero dejar sin recordar a quienes fueron mis compañeros del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital La Paz,: a residentes y adjuntos. A los primeros, con los que inicié mi andadura en la Cirugía Pediátrica, y con quienes he compartido los aspectos personales de una de las etapas más importantes de mi vida. A los segundos, por aportar su grano de arena en mi formación y por ser los responsables de la cirujana pediátrica en la que me he convertido.

También, a mis actuales compañeros del Hospital Universitario Niño Jesús, con los que tengo la suerte de compartir mi día a día, y que con su comprensión han soportado mis ánimos y desánimos en la etapa final de esta tesis doctoral. Por su apoyo, facilitando mi dedicación a este proyecto. Por hacerme sentir privilegiada de formar parte de su equipo. Y cómo no, por rescatar mi ordenador tantas veces olvidado en cualquier rincón de este hospital...

Para concluir, y con más énfasis si cabe, quiero dedicar estas últimas palabras a mi familia.

A mis padres, por haberme transmitido siempre los mejores valores morales, por su sentido de la responsabilidad, justicia y solidaridad. Por su gran capacidad de trabajo, de superación y progresión; y por enseñarme la necesidad del esfuerzo para la obtención de nuestras metas. Por haberme apoyado siempre en todos mis proyectos, eliminando cualquier obstáculo que pudiera interponerse en mi camino. Por su incansable dedicación, y en definitiva: por creer en mí. Ellos han sido, son y serán para mí el mejor referente y modelo a seguir: a ellos les debo ser quien soy.

A mi hermano Jesús, por estar ahí, por su bondad, por su confianza en mí.

A Javier: por su ayuda. Por su capacidad de escuchar y comprender. Por haber asumido en todo momento mi implicación en este trabajo y haber suplido desde el silencio y con convencimiento las ausencias en mis labores familiares durante el mismo.

Y para terminar, a mis hijos: Carolina y Daniel. Por la suerte de poder compartir sus vidas. Por haber soportado con naturalidad mis ausencias durante mi implicación en este proyecto. Por su amor, y por todo lo que me dan día a día, que nunca yo podré devolver.

INDICE

JUSTIFICACION	17
INTRODUCCION	19
1. La Hernia Diafragmática Congénita.....	19
1.1. Definición. Epidemiología	19
1.2. Anatomía y embriología del diafragma	19
1.3 Etiopatogenia. Generalidades	21
1.4 Etiopatogenia. La vía del ácido retinoico	23
1.5 Etiopatogenia. Los factores genéticos	24
2. La Hernia Diafragmatica Congenita Humana.....	25
2.1. Fisiopatología y clínica. Malformaciones asociadas	25
2.2 Tratamiento médico	28
2.3 Tratamiento quirúrgico	30
2.4 Intervención prenatal	30
2.5 Evolución a largo plazo	31
3. La HDC en animales. Modelo inducido con nitrofen.....	32
3.1. Generalidades	32
3.2. Efectos del nitrofen sobre el pulmón	33
3.3. Espectro malformativo	34
3.4. Mecanismo de acción del nitrofen	34
4.- La cresta neural.....	37
4.1. Generalidades	37
4.2. Antecedentes históricos	38
4.3. Formación, migración y diferenciación de las células de la CN	39
4.4. La Cresta Neural Craneal (CNC)	41
4.5. La Cresta Neural del Tronco (CNT)	44
4.6. El aparato faríngeo	44
4.6.1. Generalidades	44
4.6.2. Los arcos y bolsas faríngeas en el embrión humano	46
4.6.3 El timo, los linfocitos T y las células C	49
4.6.4. La regulación del metabolismo fosfocálcico	54
4.6.4.1. Estructura y composición del hueso. Remodelación ósea	56
4.6.4.2. Osteoporosis en la población pediátrica	63
4.7. El corazón y los grandes vasos. La CN cardiaca	67
4.7.1 El corazón	67
4.7.2. Los vasos sanguíneos. Embriogénesis	69
4.7.3. El sistema arterial	69
4.7.4. El sistema venoso	72
4.7.5. El sistema cardiovascular en la rata. Diferencias embriológicas y anatómicas	75
4.7.6. La Cresta Neural Cardiac	82

4.8. Las neurocristopatías	84
4.8.1 Cardiopatías troncoconales	84
4.8.2 Síndrome de delección 22q11.2	85
4.8.3 Otros defectos craneofaciales	86
4.8.4 Tumores	86
4.8.5 Enfermedad de Hirschsprung	86
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	87
MATERIAL Y METODOS	89
1.- Estudio clínico en pacientes con HDC.....	89
1.1. Pacientes	89
1.2. Grupo control	90
1.3. Confidencialidad y Supervisión por el Comité Ético	91
1.4. Evaluación clínica de los pacientes con HDC	91
1.5. Exploraciones complementarias	93
1.5.1. Estudio de la función inmunitaria tímica	93
1.5.2. Estudio del metabolismo fosofocálcico	94
1.5.3 Estudio de la masa ósea. Densitometría ósea	96
2. Estudio histológico del tiroides en autopsias de pacientes con HDC.....	97
2.1. Pacientes	97
2.2. Inmunohistoquímica	98
2.3. Contaje celular	98
3. Estudio experimental en ratas. Malformaciones cervicotorácicas.....	100
3.1. Animales	100
3.2. Fecundación controlada	100
3.3. Administración del teratógeno	100
3.4. Obtención y examen de los fetos	100
3.5. Grupos experimentales	100
3.6. Estudios de microresonancia magnética	101
4. Análisis estadístico.....	104
RESULTADOS	105
1.- Estudio clínico en pacientes con HDC.....	105
1.1. Características de la serie. Morbilidad asociada	105
1.2. Función inmunitaria tímica	107
1.3. Metabolismo fosfocálcico	110
1.4. Mineralización ósea	110
2.- Estudio histológico del tiroides en autopsias de pacientes con HDC.....	115

3.- Estudio experimental en ratas. Malformaciones cervicotorácicas.....	117
3.1. Animales de estudio. Glándula tímica	117
3.2. Sistema respiratorio	118
3.3. Aparato cardiovascular	118
3.3.1. Grandes vasos arteriales	118
3.3.2. Corazón	119
3.3.3. Sistema venoso sistémico cervicotorácico	122
3.3.4. Vena cava inferior	126
3.3.5. Venas pulmonares	129

DISCUSION **131**

I. Estudio clínico en pacientes con HDC.....	132
1.1. Estudio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica	132
1.1.1. Análisis de nuestros resultados	132
1.1.2. Justificación del estudio de los linfocitos totales. Evidencias de la influencia de la CN en la diferenciación y maduración del timo	134
1.1.3. Metodología utilizada. Limitaciones	136
1.1.4. Implicaciones clínicas	137
1.2. Estudio del metabolismo fosfocálcico	138
1.2.1. Análisis de nuestros resultados	138
1.2.2. Disfunción paratiroidea en trastornos neurocristales	139
1.2.3. Metodología utilizada. Limitaciones	140
1.2.4. Implicaciones clínicas	142
1.3. Valoración de la masa ósea	143
1.3.1. Análisis de nuestros resultados	143
1.3.2. Metodología utilizada. Limitaciones	145
1.3.3. Implicaciones clínicas	146
2. Estudio histológico del tiroides en autopsias de pacientes con HDC.....	148
2.1. Análisis de nuestros resultados	148
2.2. Disminución de las células C: otra alteración neurocristal en la HDC	148
2.3.- Metodología utilizada. Limitaciones	149
3. Estudio experimental en ratas. Malformaciones cervicotorácicas.....	150
3.1. Análisis de nuestros resultados	150
3.2. Desarrollo del sistema venoso sistémico y su posible relación con la CN: Datos experimentales y clínicos	153
3.3. La RM como herramienta en estudios experimentales. Nuestra experiencia en el modelo HDC-Nitrofen	154
3.4. Metodología utilizada. Limitaciones	158

CONCLUSIONES **161**

BIBLIOGRAFIA	163
---------------------	------------

ANEXOS	181
---------------	------------

ANEXO I: Autorización del CEIC del Hospital La Paz para la realización del estudio	181
--	-----

ANEXO II: Hojas de información a padres/tutores de pacientes con HDC	183
--	-----

ANEXO III: Hojas de información a participantes sanos ("Controles")	187
---	-----

ANEXO IV: Consentimiento informado por escrito del padre/tutor	191
--	-----

ANEXO V: Protocolo del estudio clínico	193
--	-----

ANEXO VI: Resultados de la cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias en los pacientes con HDC y los sujetos del grupo Control	197
--	-----

JUSTIFICACIÓN

La hernia diafragmática congénita (HDC) es una entidad caracterizada por una alta mortalidad y un elevado número de malformaciones asociadas que provocan en los supervivientes importantes secuelas. La etiología de la HDC es desconocida, pero el complejo malformativo que acompaña al defecto diafragmático hace sospechar que existe una alteración de los mecanismos reguladores de la organogénesis vehiculados por la cresta neural (CN), en su origen.

La CN es una estructura embrionaria considerada como una hoja germinal más, de la que derivan una gran cantidad de tipos celulares, tejidos y órganos. La pluripotencialidad de sus células y su capacidad de migrar a diferentes órganos diana son sus principales características. En determinadas enfermedades o complejos malformativos existe un patrón de alteraciones que afectan a estructuras derivadas de la CN, por lo que son conocidas como neurocristopatías.

La HDC puede, en determinadas circunstancias, ser considerada como una neurocristopatía más. La asociación de malformaciones cardiovasculares, craneofaciales o branquiales al defecto diafragmático, hacen pensar que la CN está de alguna forma ligada al origen de esta entidad.

El modelo experimental de HDC inducida con el herbicida nitrofen en ratas, ha permitido demostrar la similitud del modelo murino y la entidad humana, no sólo en el defecto primario y en la hipoplasia pulmonar asociada, sino, lo que es casi más importante, en todo el cortejo malformativo acompañante. Las condiciones controladas de laboratorio han facilitado la comprensión de los mecanismos moleculares y genéticos involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad. De hecho, muchas de las alteraciones primero descritas en la rata, lo han sido *a posteriori* en el humano.

Hasta hoy son muchas las estructuras derivadas de la CN que han sido estudiadas tanto en la HDC humana como en la experimental. Este trabajo se centra en algunas no descritas hasta ahora, bien por la dificultad de su estudio en animales, bien por la complejidad de su análisis en humanos. Tanto la función tímica como el metabolismo fosfocálcico están en íntima relación con algunas estructuras o células neurocristales y existen evidencias experimentales de su alteración en la HDC inducida con nitrofen. Ocurre lo mismo con el sistema venoso central, también derivado de las células de la CN, que aún no ha sido investigado en el modelo experimental de hernia.

Para intentar estos objetivos se ha elaborado un diseño mixto clínico-experimental, con un estudio casos-control y una revisión de material necrópsico por una parte, y un análisis de malformaciones venosas en condiciones de laboratorio por otra. Dicho diseño nos ha permitido comprobar una vez más el paralelismo entre las dos condiciones y, lo que es más importante, nos ha hecho conocer mejor a los pacientes supervivientes a una HDC.

INTRODUCCIÓN

I. LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA (HDC)

I.1. DEFINICIÓN. EPIDEMIOLOGÍA:

La Hernia Diafragmática Congénita (HDC) es una malformación consistente en un orificio diafragmático a través del cual se introducen las vísceras abdominales al tórax durante el desarrollo embrionario. Ocurre con una frecuencia de 1/3500-5000 recién nacidos vivos¹⁻³ y, debido a la hipoplasia pulmonar acompañante y a la asociación de malformaciones graves, fundamentalmente cardíacas, su mortalidad es muy elevada a pesar de los grandes avances en terapia neonatal intensiva⁴. Dicha mortalidad se sitúa en torno al 40% en los recién nacidos con HDC pero aumenta al 60% si se tienen en cuenta los abortos o mortinatos⁵⁻¹⁰.

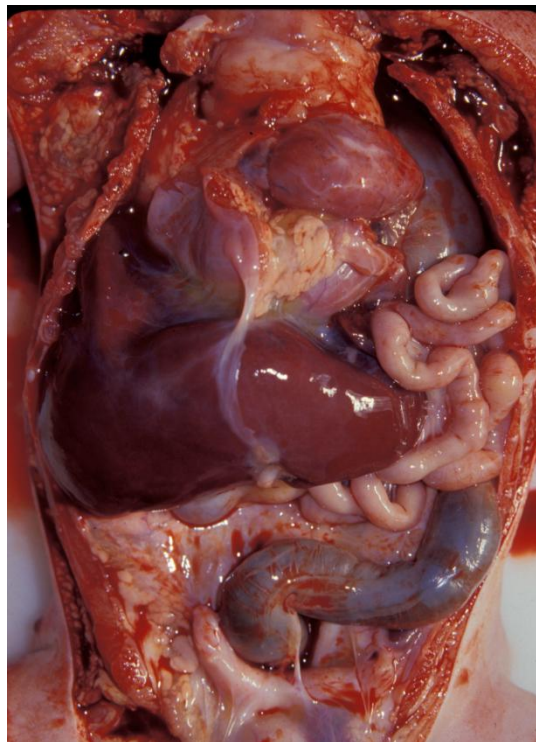


Figura 1. Imagen correspondiente a un recién nacido con HDC bilateral, fallecido tras el nacimiento. Puede observarse la herniación de intestino delgado y bazo en el hemitórax izquierdo, y del lóbulo hepático derecho en el hemitórax del mismo lado; así como la hipoplasia pulmonar bilateral, que causó el fallecimiento del paciente.

La incidencia es similar en los dos sexos y la gran mayoría de los casos son esporádicos, con sólo un 2% de asociaciones familiares¹¹. La forma de presentación clínica más frecuente es la HDC aislada, entendiendo por ésta la que no forma parte de síndromes o genopatías. Sin embargo, frecuentemente se acompaña de otras malformaciones siendo las cardiopatías las más comunes y graves^{5, 10, 12-14}.

Dentro de las formas sindrómicas, la HDC puede asociarse al síndrome de Fryns, caracterizado además de por la hernia, por facies tosca, hipoplasia acra, onfalocele y cardiopatía. Su herencia es autosómica recesiva y está causado por delecciones en los cromosomas 15 y 8^{15, 16}. También puede formar parte del síndrome de CHARGE, acrónimo en inglés de la asociación de coloboma, atresia de coanas, malformaciones cardíacas, retraso mental, hipoplasia genital y deformidades auriculares. Y también en ocasiones de cromosomopatías como las trisomías 13 ó 18. Todas estas situaciones constituyen los cuadros clínicos más graves, en los que la mortalidad puede alcanzar el 100%¹⁷⁻¹⁹.

Se han descrito algunos casos asociados a la exposición de fármacos y agentes químicos como la talidomida, la quinina, el cadmio o el nitrofen^{20, 21}, e incluso a dietas deficitarias en vitamina A²², lo que ha propiciado un amplio campo de investigación sobre el papel de los retinoides en el origen de la HDC, como se detallará más adelante²³⁻²⁸.

Anatómicamente, el tipo más frecuente es la conocida como hernia de Bochdalech, en la que el defecto diafragmático es posterolateral. La hernia de Morgagni, en la que el defecto es anteromedial, constituye menos del 2% de las hernia diafragmáticas y su curso suele ser paucisintomático, insidioso y tan solo en ocasiones origina síntomas digestivos moderados o graves.

El 80% de las HDC son de localización izquierda, el 20% derechas y menos del 2% bilaterales. Aunque se han publicado series con peor evolución para las HDC de localización derecha^{4, 29, 30} debido a una mayor asociación de malformaciones graves, mayor requerimiento de soporte vital avanzado o de la corrección quirúrgica con prótesis, otras publicaciones han presentado resultados contrarios³¹.

1.2. ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA DEL DIAFRAGMA:

La HDC se produce como consecuencia de un fallo en el desarrollo y fusión de los distintos componentes embrionarios que dan lugar al diafragma coincidiendo con el retorno intestinal a la cavidad abdominal en torno a la semana 10ª de gestación. En este desarrollo intervienen:

- a) *El Septum transversum*: tejido mesodérmico que forma el tendón central del diafragma. Crece dorsalmente desde la pared ventrolateral del cuerpo para separar el corazón y el hígado al final de la cuarta semana de gestación (SDG). Esta estructura no separa completamente las cavidades pericárdica y abdominal, dejando una comunicación a ambos lados del esófago conocida como canal pericardioperitoneal.
- b) *Las membranas pleuroperitoneales*: se fusionan con el mesenterio dorsal del esófago y el *septum transversum* ocupando los canales pericardioperitoneales, completando así la división entre las cavidades torácica y abdominal.
- c) *El mesenterio dorsal del esófago*: forma la parte media del diafragma, los pilares diafragmáticos.
- d) *El crecimiento muscular desde las paredes corporales laterales*, que da lugar a las porciones más periféricas del diafragma, externamente a las membranas pleuroperitoneales en las semanas 9ª-10ª.

La separación de las cavidades pleural y peritoneal mediante la muscularización de las membranas pleuroperitoneales es más tardía en la región posterolateral diafrágica, descrita por Bochdalek en 1848 y razón por la que el sitio más común de presentación de la HDC lleva su nombre.

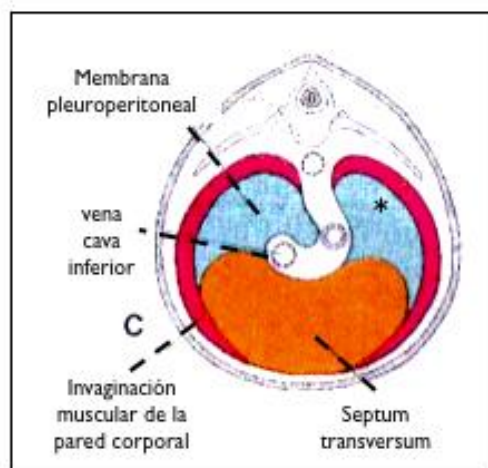


Figura 2.- Dibujo que muestra los distintos componentes que forman el diafragma durante el primer trimestre del desarrollo embrionario. El asterisco (*) representa la región posterolateral izquierda de las membranas pleuroperitoneales donde más comúnmente, se produce la hernia diafrágica congénita o hernia de Bochdalek. Modificado de: Moore, 2004 ³².

Desde el punto de vista embriológico, es importante recordar que la formación del diafragma coincide cronológicamente con los procesos de rotación y fijación del intestino dentro del abdomen (7^a-9 semanas), de tal forma que las vísceras herniadas en el tórax se encuentran en una situación de malrotación de forma constante. Además, en el 10% de los casos, las vísceras abdominales herniadas están cubiertas por un saco de tejido peritoneal, que es aconsejable resear completamente para evitar futuras recidivas.

1.3. ETIOPATOGENIA. GENERALIDADES:

La etiología exacta de la HDC es aún desconocida, muy probablemente multifactorial, en la que influyen factores genéticos, moleculares y ambientales. La investigación con modelos animales ha sido fundamental en el estudio de la génesis de la HDC, destacando por orden cronológico los que citamos a continuación:

- 1.- Un modelo “ambiental o dietético” por déficit de Vitamina A, descrito en la década de los años 40, en el que ratas preñadas se sometían a dietas deficitarias en esta vitamina para la obtención de fetos con HDC^{33, 34}.
- 2.- Un modelo teratogénico surgido en la década de los 80^{20, 35} mediante la administración del herbicida nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter) a ratas progenitoras de fetos con HDC. Este modelo se detalla más adelante. Existen otros compuestos que inducen también HDC en roedores, aunque su uso está menos extendido.

3. Varios modelos quirúrgicos en los que el defecto diafragmático es creado manualmente durante la gestación²¹.

4.- Un modelo genético, a partir de los años 90, mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética y la obtención de animales mutantes y/o transgénicos.

Se ha podido demostrar que con la utilización de estos modelos experimentales se obtienen fetos con HDC con similares defectos diafragmáticos a nivel de los pliegues pleuroperitoneales, de predominio en el lado izquierdo y que comparten las mismas características que los defectos diafragmáticos observados en humanos^{27, 36-38}. Estos modelos han supuesto un salto de calidad en el conocimiento de la etiopatogenia de la HDC humana, y constituyen por sí mismos un campo científico activo y en continua expansión.

Por otra parte, la demostración de una casi constante asociación de la HDC a hipoplasia pulmonar y a otras malformaciones congénitas, hace suponer que la hernia sea una embriopatía compleja en la que los mismos factores etiológicos que influyen en el desarrollo del diafragma, lo hagan también sobre el pulmón y el resto de órganos afectados en esta enfermedad. De hecho, las investigaciones sobre la hipoplasia pulmonar y las malformaciones presentes en el modelo teratogénico inducido con nitrofen y en modelos transgénicos, han sido determinantes en los conocimientos que hoy tenemos sobre la etiopatogenia de la hernia.

En estos estudios se ha confirmado una etiología molecular y genética común para el defecto diafragmático, la hipoplasia pulmonar y el maldesarrollo de otros órganos como el corazón o el esqueleto que se encuentran tan frecuentemente afectados en los pacientes y animales con HDC. El hecho de que la hipoplasia pulmonar sea bilateral y no revierta tras la corrección quirúrgica del diafragma refuerza aún más la teoría de que la HDC sea una embriopatía con un componente malformativo pulmonar primario y no sólo una consecuencia de la compresión torácica por las vísceras herniadas³⁹.

Se ha constatado además, que esta interrupción en el desarrollo pulmonar se produce en las primeras semanas de gestación durante la fase pseudoglandular (6^a-16^a semanas), período en el que se produce la división, ramificación bronquial y formación de los bronquiolos terminales, de forma que su alteración afecta al desarrollo de bronquiolos respiratorios y alveolos y, en definitiva, al correcto intercambio gaseoso.

Por último, es obligado hablar de la Cresta Neural (CN) en el contexto de la patogenia de la HDC, sobre todo en relación a sus malformaciones asociadas. La frecuente afectación de órganos derivados de la CN como defectos del tubo neural, el corazón, el esqueleto craneofacial y axial, o las glándulas del cuello (timo, tiroides y paratiroides), tanto en animales como en pacientes con HDC^{12-14, 40-42}, hacen suponer que la CN está involucrada en el origen de estas malformaciones, existiendo en último término una relación causal entre CN, HDC y todo su complejo malformativo^{10, 43}.

I.4. ETIOPATOGENIA. LA VÍA DEL ÁCIDO RETINOICO:

La hipótesis molecular más defendida en la actualidad en la génesis de la HDC es una alteración en el metabolismo de los retinoides⁴⁴, ya sea en los receptores del principio activo (el ácido retinoico) o en los niveles deficitarios de su precursor (la vitamina A). Estas alteraciones estarían mediadas por mecanismos teratogénicos y/o genéticos^{22, 27}. Así, se ha comprobado que ratas con dietas deficitarias en vitamina A tienen un 25-60% de su descendencia con HDC^{33, 34, 45}, además de hipoplasia pulmonar y otras malformaciones cardíacas, genitourinarias, oculares o del esqueleto craneofacial, que revierten o disminuyen de intensidad con la administración de dicha vitamina o de sus derivados durante la gestación⁴⁶.

En el mismo sentido se ha demostrado una disminución del número e intensidad de las malformaciones tras la administración de esta vitamina en el modelo de HDC inducida con nitrofen^{26, 28, 47}. Otros autores han demostrado una disminución de los niveles de retinol en los pulmones hipoplásicos de animales con HDC expuestos a nitrofen⁴⁸. Además mediante la utilización de modelos genéticos se ha probado que ratones mutantes para receptores del ácido retinoico (RAR) tienen hipoplasia pulmonar, asociada en un porcentaje de casos a HDC y a otras malformaciones típicas presentes en los pacientes con hernia como cardiopatías troncoconales, anomalías esqueléticas o alteraciones en el desarrollo del timo, tiroides y paratiroides^{23, 49}. Además, los experimentos dirigidos al conocimiento de los mecanismos de acción del nitrofen mediante cultivos celulares, han confirmado defectos metabólicos en la síntesis del ácido retinoico a partir de la vitamina A, como punto clave en la génesis tanto de la HDC como de la hipoplasia pulmonar⁵⁰. En concreto disminuciones de la enzima limitante de su síntesis, la retinal-dehidrogenasa tipo 2 (RALDH2)⁵¹⁻⁵³.

Frecuencia HDC	Malformaciones asociadas	Rescate	Referencia bibliográfica
25%	N/A	Aceite de hígado de pescado	Andersen, 1941
60%	Malformaciones renales Hipospadias Alteraciones oculares Defectos arco aórtico Cardiopatías septales Agenesia pulmonar Fístula traqueoesofágica	Retinol	Warkany et al, 1948
31%	Malformaciones urogenitales Malformaciones oculares Cardiopatías septales Defectos arco aórtico Agenesia/hipoplasia pulmonar	Retinol	Wilson et al, 1953
-	Hipoplasia maxilar/mandibular Malformación cerebral Malformaciones vena cardinal anterior	*ATRA	White et al, 1998

Tabla I.- Modelos de rata de HDC producidos por déficit de vitamina A. En todos los casos, el retinol o sustancias ricas en retinol (como el aceite de hígado de pescado de los primeros experimentos de Andersen, 1941) disminuían la frecuencia de aparición de HDC y de las demás malformaciones originadas por deficiencia de vitamina A. *ATRA: "Retinyl palmitate, all trans retinoic acid".

En este sentido, y continuando en el estudio de los mecanismos de acción del nitrofen y en concreto, en busca de mecanismos patogénicos similares en el origen de la hipoplasia pulmonar y de la HDC que refuercen la hipótesis de un origen teratogénico común, han sido de vital importancia las investigaciones con explantes pulmonares en este modelo experimental. Así, estudios morfológicos in vitro de explantes pulmonares de ratas expuestas a nitrofen en épocas embrionarias previas al cierre del diafragma, han confirmado la existencia de hipoplasia pulmonar con disminuciones del área y perímetro pulmonares, y de las divisiones bronquiales⁵⁴. Estas alteraciones se recuperan tras la adición de ácido retinoico en los medios de cultivo de los explantes⁵⁵.

Todos estos hallazgos evidencian la existencia de hipoplasia pulmonar previa incluso a la aparición de la hernia diafragmática. Dicha hipoplasia se potenciaría posteriormente con la compresión ejercida por las vísceras herniadas, concepto descrito como “*The dual-hit hypothesis*” por Tibboel y sus colaboradores en la última década³⁹.

Por otra parte, investigaciones recientes en humanos, han demostrado disminuciones en los niveles sanguíneos de retinol y de su proteína transportadora (RBP, del inglés *retinol binding protein*) en recién nacidos con HDC comparados con un grupo control^{25, 56}, imitando las alteraciones en la homeostasis de los retinoides observada en los modelos experimentales de HDC⁴⁸. Algunos estudios epidemiológicos en humanos parecen demostrar esta teoría⁵⁶.

Además de los retinoides, se han descrito además otros mediadores moleculares presentes en el desarrollo pulmonar. Entre ellos están el FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y los proteoglicanos, en concreto el heparán sulfato, que serían necesarios para la creación de un adecuado microambiente celular que garantice un correcto desarrollo pulmonar^{57, 58}. Se ha confirmado una reactivación del desarrollo pulmonar en medios de cultivo ricos en dichos factores de crecimiento, así como ausencia de respuesta en los pulmones hipoplásicos expuestos a nitrofen^{58, 59}.

1.5. ETIOPATOGENIA. LOS FACTORES GENÉTICOS:

Existe una relación entre la HDC y la regulación genética ejercida por un grupo de genes llamados Hox. Esta familia, descrita por primera vez en la mosca *Drosophila melanogaster*⁶⁰ está constituida en el humano por 39 genes que se distribuyen en 4 grupos de genes: Hoxa, Hoxb, Hoxc y Hoxd, localizados en los cromosomas 7,17,12 y 2 respectivamente^{61, 62}.

Contienen la información sobre la segmentación axial del embrión y codifican múltiples factores de transcripción (entre otros *Sonic Hedgehog –Shh–*, *Thyroid Transcription Factor-1 –TTF-1–* y proteínas *Gli*) que autorregulan su propia transcripción y la de otros genes que participan en el desarrollo de órganos y tejidos en el eje anteroposterior del embrión. Influyen también en la diferenciación y migración de las células de la CN en el proceso de organogénesis regional, habiéndose demostrado su implicación en la formación de estructuras faríngeas derivadas de los arcos branquiales, el corazón, las vértebras, el intestino anterior y la división traqueobronquial, el pulmón o la innervación entérica, órganos todos ellos de origen en parte neurocristal⁶²⁻⁶⁵.

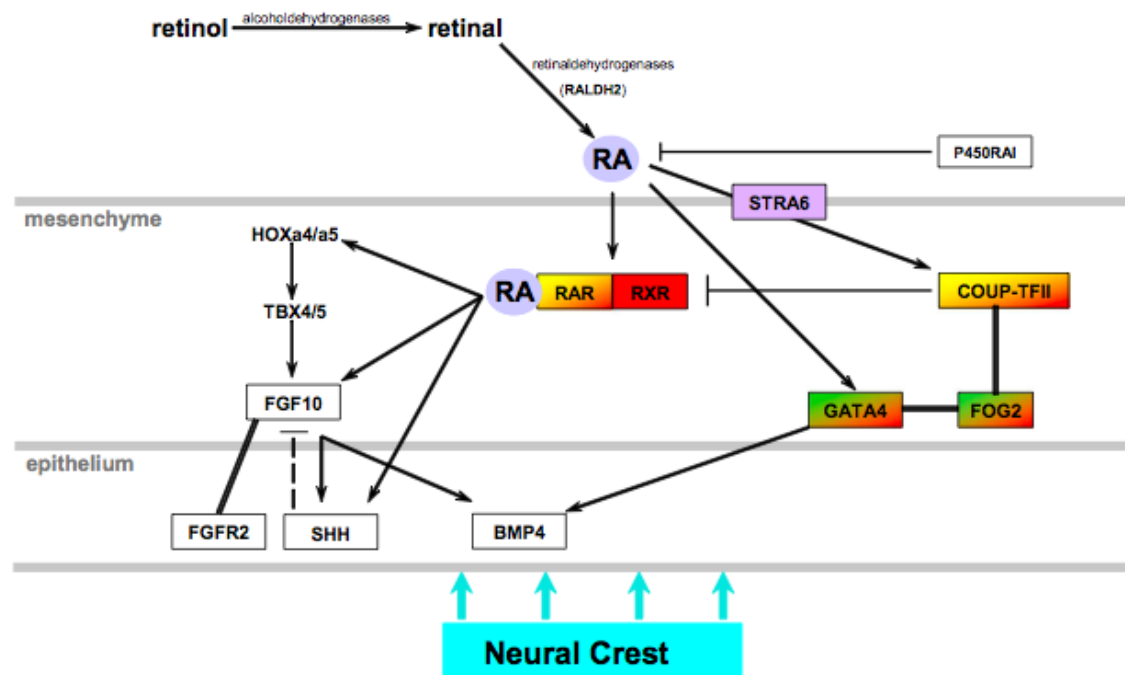


Figura 3.- Representación esquemática de las vías genéticas y moleculares involucradas hasta la fecha en la etiopatogenia de la hipoplasia pulmonar asociada a la HDC. Tomada de Klaassens, 2009⁶⁶

Como resumen, y para entender el origen multifactorial de la hernia diafragmática y su cortejo malformativo, hay que suponer un escenario de interacciones entre las distintas señales moleculares, embrionarias y genéticas en las distintas hojas embrionarias que darán origen al pulmón y al diafragma. La vía metabólica de los retinoides y la adecuada expresión de determinados genes Hox ejercen influencias sobre la CN en el proceso de embriogénesis a la vez que la variación en las concentraciones de AR potencia o suprime la expresión de determinados genes Hox⁶⁷, que a su vez influirán en los mecanismos organogenéticos de la CN^{23, 43, 49}.

2. LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA HUMANA

2.1. FISIOPATOLOGÍA Y CLÍNICA. MALFORMACIONES ASOCIADAS:

La sintomatología aguda de los pacientes con HDC está causada tanto por las manifestaciones respiratorias y hemodinámicas agudas secundarias a la hipoplasia pulmonar al nacimiento, como por las malformaciones congénitas que acompañan frecuentemente a la hernia. Además, también hay manifestaciones clínicas de curso subagudo o crónico secundarias a las alteraciones anatómicas del tracto gastrointestinal, del respiratorio y de otros producidas el propio complejo sindrómico, a las que deben ser sumadas las secuelas a largo plazo derivadas del tratamiento médico y quirúrgico en estos niños.

La clínica aguda predominante de los pacientes con HDC es la dificultad respiratoria en las primeras 24 horas de vida como consecuencia de la hipoxia, hipercapnia y acidosis causadas por la hipoplasia e hipertensión pulmonares como factores desencadenantes. Estas alteraciones gasométricas favorecen a su vez el estado de hipertensión pulmonar y el establecimiento de un cortocircuito cardiaco derecha-izquierda a través del foramen oval y del ductus arterioso que perpetúa el patrón de circulación fetal, tal y como se describe en la Figura 4.

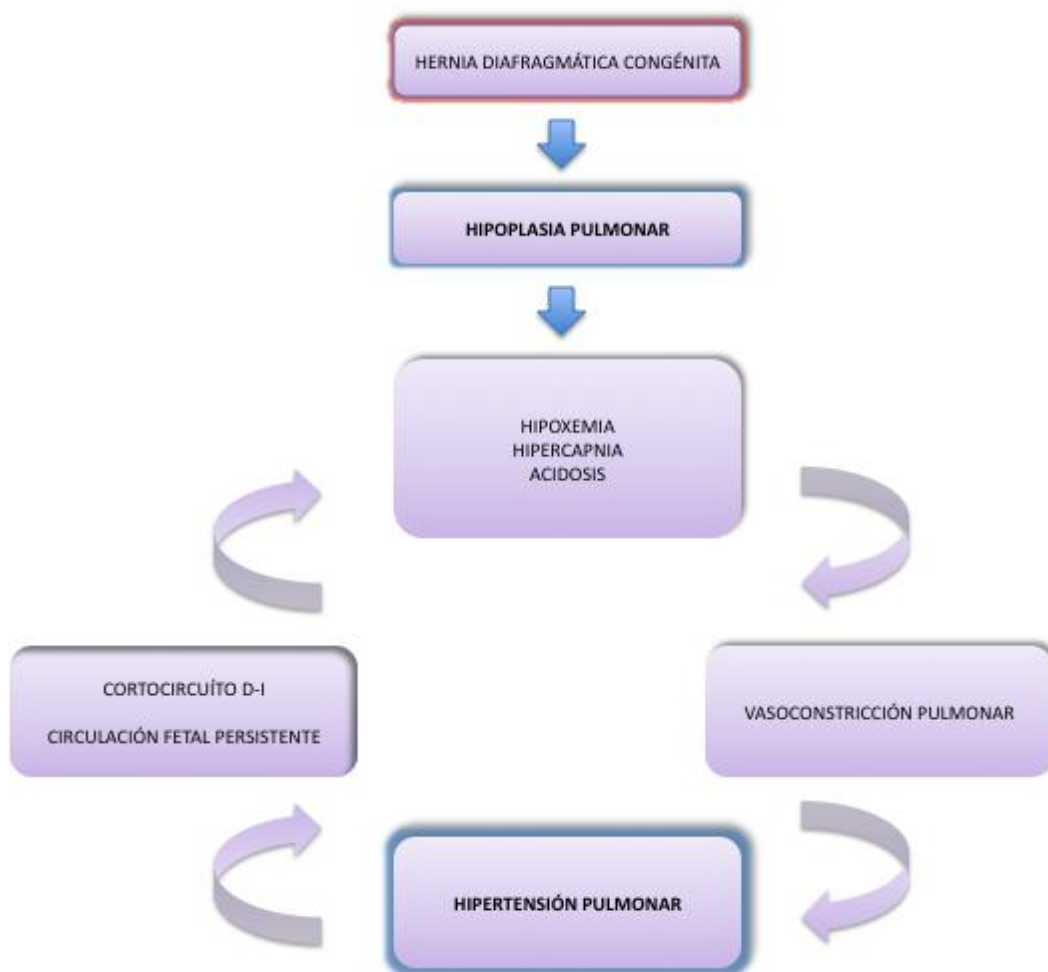


Figura 4.- Esquema que muestra la fisiopatología de la Hernia Diafrágica Congénita. El paso clave es la existencia de hipoplasia pulmonar, que deriva en hipertensión pulmonar, y ésta perpetúa el patrón de circulación fetal en el que se produce un cortocircuito derecha-izquierda (D-I) con mezcla de sangre no oxigenada y oxigenada a través del foramen oval y ductus arterioso. Estas dos estructuras que habitualmente se obliteran al nacimiento, perpetúan su permeabilidad por este cortocircuito D-I favorecido a su vez, por la hipertensión pulmonar y las altas presiones en el ventrículo derecho y en el circuito arterial pulmonar.

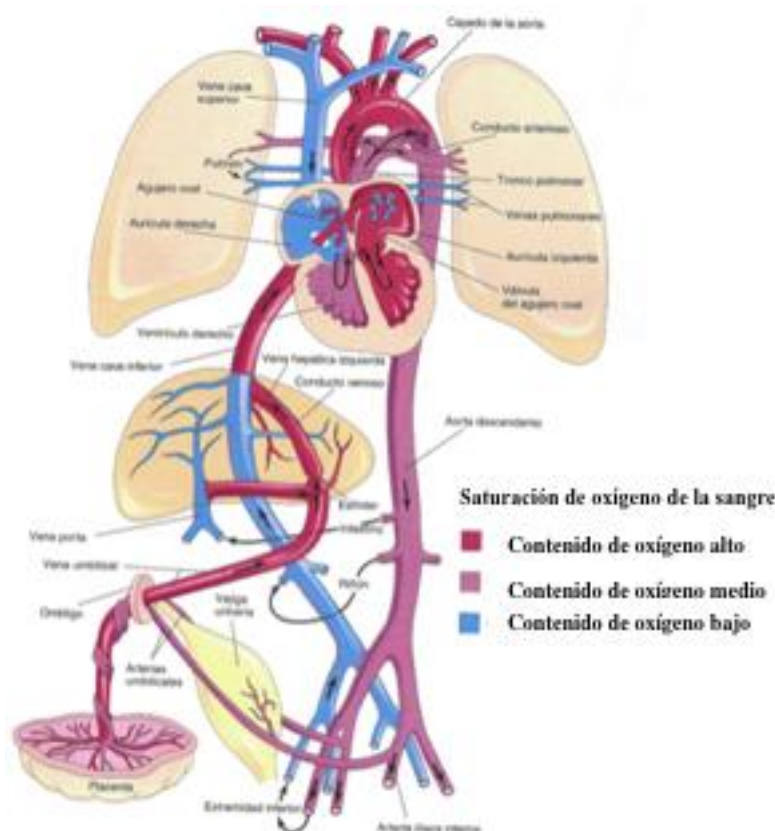


Figura 5.- Sistema circulatorio fetal humano. Puede observarse el menor grado de saturación sanguínea en comparación con la etapa postnatal. Durante la gestación, la sangre rica en oxígeno procedente de la placenta y vehiculizada por la vena umbilical, llega a través de la VCI a la aurícula derecha, donde se mezcla con la sangre no oxigenada procedente del drenaje cérvicotorácico a través de la VCS. Parte de esta sangre con alto contenido en oxígeno pasa a través del foramen oval a la AI y VI, donde sale hacia la circulación sistémica vía aorta ascendente., hasta mezclarse con la menos oxigenada procedente de la arteria pulmonar a través del ductus arterioso. A la vez, el territorio pulmonar, sometido a altas presiones por la vasoconstricción arterial secundaria a la hipercapnia e hipoxemia ante la falta de ventilación pulmonar, transmite esta hipertensión a las cámaras cardíacas derechas, perpetuando la permeabilidad del foramen oval y del ductus arterioso, y con ello, el cortocircuito derecha-izquierda. Tomado de Moore, 2004 ³²

Como se puede ver en el esquema (Figura 5), el ductus arterioso es un conducto que comunica el tronco de la arteria pulmonar con la aorta. Esta unión se produce distal a la salida de los grandes vasos del cayado aórtico, en concreto más allá de la raíz de la arteria subclavia izquierda. La sangre no oxigenada procedente del circuito pulmonar se mezcla con la oxigenada de la aorta produciendo una disminución de la saturación sanguínea en el trayecto de la aorta descendente, es decir en los miembros inferiores con respecto a los superiores. Esto traduce en la práctica clínica en lo que se denomina “gradiente pre-postductal” de la saturación sanguínea de oxígeno, medida indirecta del grado de hipertensión pulmonar.

Las malformaciones asociadas, presentes en más de la mitad de los pacientes, ocasionan una variada sintomatología e influyen de forma significativa en su morbi-mortalidad^{10, 68-70}. Como se ha comentado anteriormente, su estudio tanto en humanos como en animales, y el paralelismo con enfermedades de naturaleza neurocristal como el síndrome de DiGeorge, han permitido hipotetizar su origen y el de la propia HDC con la función organogénica de la CN. De este modo, además de las malformaciones esqueléticas, las alteraciones del cierre del tubo neural, y las anomalías de órganos derivados del desarrollo de los arcos branquiales, controlados a su vez por la CN, como el corazón o el esqueleto craneofacial, constituyen las malformaciones más frecuentemente encontradas en los pacientes con HDC^{12, 14, 40}.

Además, como se ha comentado anteriormente, se han demostrado anomalías cromosómicas en un grupo minoritario de pacientes (<5%) que constituyen las llamadas “formas síndrómicas”. El síndrome genético más frecuente es el síndrome de Fryns, caracterizado entre otros por HDC, facies peculiar, hipoplasia acra y onfalocele^{11, 71}. Las cromosomopatías más diagnosticadas son las trisomías 21, 13 ó 18⁷², y la alteración estructural más descrita es la delección 15q26⁷³. En ésta última, coexisten HDC, malformaciones cardíacas y craneofaciales similares a las observadas en el síndrome de Fryns, de nuevo un complejo malformativo neurocristal.

El 10% de los pacientes con HDC presentan un curso subagudo con retrasos del crecimiento, o con síntomas digestivos, sin hipoplasia pulmonar ni otras malformaciones graves asociadas; y por lo tanto con un excelente pronóstico. El reflujo gastroesofágico (RGE), presente en más del 50% de los pacientes⁷⁴⁻⁷⁸ o los cuadros de obstrucción intestinal son la clínica digestiva más habitual, y se han atribuido clásicamente a la situación de malrotación intestinal o a las propias alteraciones anatómicas en la posición esofagogástrica^{77, 79}. En los últimos años además, se han demostrado alteraciones de la inervación esofágica intrínseca, también dependiente de la CN, que pueden justificar la presencia de RGE en estos pacientes^{80, 81}.

2.2. TRATAMIENTO MÉDICO:

En los casos diagnosticados prenatalmente se debe planear el parto en un hospital terciario en el que se asegure un tratamiento multidisciplinario por equipos de cuidados intensivos neonatales y de cirugía pediátrica. Siempre que sea posible se dejará evolucionar la gestación a término⁸², y la vía de parto se elegirá en función de los factores obstétricos independientes a la malformación diafragmática. El tratamiento materno con corticoides para favorecer la maduración pulmonar ha sido un tema en controversia, considerándose actualmente sólo en aquellos casos de parto pretérmino, igual que en la población general^{83, 84}.

Las primeras medidas a adoptar van encaminadas a la estabilización hemodinámica y respiratoria del paciente mediante la intubación, oxigenoterapia, sueroterapia y la administración de agentes inotrópicos si son necesarios. El objetivo del tratamiento neonatal durante esta fase aguda es asegurar una adecuada oxigenación tisular evitando la aplicación de presiones ventilatorias elevadas que favorezcan la agresión pulmonar por barotrauma. En este sentido ha sido fundamental el concepto de “ventilación suave” desarrollado en los años 90 por el grupo del *Columbia Presbyterian Hospital* de Nueva York, en el que se incluyen la ventilación a alta frecuencia oscilatoria (VAFO) y la hipercapnia permisiva (mantenimiento de niveles de PCO₂ entre 45 y 60 mmHg)⁸⁵⁻⁸⁷. Este tratamiento constituye la piedra angular del tratamiento intensivo, ya que ha sido la única medida, junto con el tratamiento quirúrgico electivo, que ha demostrado una mejora de la supervivencia en los pacientes con HDC^{8, 88-90}.

Dentro de las terapias ventilatorias, constituye también un hito importante el desarrollo de la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) utilizada en la HDC desde el final de la década de los años 70⁹¹. Mediante una bomba de oxigenación y un cortocircuito arteriovenoso se consigue un adecuado soporte respiratorio o cardiorrespiratorio, dejando al pulmón y corazón en reposo mientras mejora la situación de hipertensión pulmonar. El parámetro que actualmente y de forma universal se considera para la inclusión de un paciente en ECMO es el denominado *índice de oxigenación (IO)*, que traduce la intensidad de soporte ventilatorio requerido para obtener una buena oxigenación tisular. Viene definido por la presión media en la vía aérea (PMA) y la fracción inspiratoria de O₂ (FiO₂), que por ser variables externas hacen que su valor no sea una medida absolutamente objetiva, y justifica la diferencia de los resultados publicados en cuanto a la eficacia del ECMO en el tratamiento de la HDC⁹²⁻⁹⁵.

$$IO = PMA \times FiO_2 \times 100 / P_aO_2$$

PMA = presión media de la vía aérea

P_aO₂ = presión parcial de oxígeno postductal.

FiO₂ = fracción inspiratoria de oxígeno.

Se aceptan de forma consensuada valores de IO mayores de 35-45 como indicación del tratamiento con ECMO, siempre que no concurren contraindicaciones absolutas tales como un peso menor de 2 kg, la edad gestacional menor de 34 semanas o la existencia de una enfermedad hemorrágica o neurológica graves.

Lejos de demostrar una mejora de la supervivencia, la heterogeneidad de las muestras de estudio, de los criterios de inclusión en el tratamiento con ECMO y la ausencia de estudios poblacionales, explican la falta de resultados concluyentes sobre la eficacia de esta terapia para disminuir la mortalidad. Más aún, la alta morbilidad asociada al tratamiento con ECMO (con complicaciones como hemorragia intracraneal, insuficiencia cardíaca de bajo gasto o insuficiencia renal), ha contribuido en muchos casos a un aumento de la mortalidad⁹⁶.

Como tratamiento específico de la hipertensión pulmonar se han propuesto fármacos vasodilatadores que actúan selectivamente sobre los vasos pulmonares como el óxido nítrico inhalado o los inhibidores de las fosfodiesterasas, como el Sildenafil o la Milrinona. A través de distintos mecanismos estas sustancias actúan sobre el GMP cíclico, que mediante la acción de proteinquinas bloquea los canales de calcio disminuyendo los niveles intracelulares de este ión, produciendo la relajación del músculo liso arteriolar en el circuito pulmonar.

A pesar de haberse constatado mejorías en la oxigenación o una menor necesidad de ECMO, tampoco se ha podido demostrar un aumento de la supervivencia con este tipo de fármacos. El hecho de que el sustrato anatomopatológico de la HTP en esta enfermedad sea una hipoplasia irreversible, justificaría la incapacidad para demostrar una mejora real de la supervivencia con este tipo de tratamientos^{8, 97}. Por último, la administración de surfactante ha sido otra opción más propuesta en el tratamiento médico de los RN con HDC. Sin embargo, a pesar de haberse demostrado déficits o inmadurez de sus componentes en los modelos experimentales de HDC^{98,99}, no se han podido confirmar estas deficiencias en humanos ni efectos beneficiosos de su administración en estudios más recientes, por lo que sólo se aconseja su uso en el subgrupo de pacientes prematuros^{100, 101}.

2.3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO:

Actualmente la corrección quirúrgica de la malformación diafragmática se considera cuando se ha conseguido la estabilización hemodinámica y respiratoria del paciente en función de parámetros objetivos que deben protocolizarse en las unidades de cuidados intensivos y que están extensamente recogidos en la literatura. Se trata por lo tanto de una intervención electiva, que ha contribuido en gran medida a mejoras en la supervivencia de estos pacientes¹.

La corrección quirúrgica se realiza habitualmente mediante laparotomía subcostal izquierda, tras la reducción de las vísceras herniadas hacia la cavidad abdominal. El cierre del defecto diafragmático se lleva a cabo mediante sutura primaria cuando existe suficiente rodete diafragmático nativo (más frecuentemente anterior) o mediante la colocación de material protésico en los casos de defectos diafragmáticos muy amplios¹⁰². En el 10% de los casos existe un saco herniario que es obligado resear para evitar el riesgo de futuras recidivas¹⁰³. Se ha demostrado que los niños tratados con sustituciones protésicas constituyen un grupo de peor pronóstico con mayores requerimientos ventilatorios, mayor morbilidad y mayor tasa de reherniación^{104, 105}. Se han propuesto otras técnicas para la reconstrucción diafragmática mediante la utilización de colgajos musculares, con resultados comparativos variables con respecto a la utilización de materiales sintéticos^{106, 107}.

Por último, es posible el tratamiento quirúrgico con abordajes mínimamente invasivos mediante toracoscopia en aquellos casos con buena evolución clínica, con estabilidad respiratoria y hemodinámica que no requieren terapias neonatales intensivas^{108, 109}.

2.4. INTERVENCIÓN PRENATAL:

La ecografía prenatal es capaz de detectar una HDC en más de la mitad de los casos, por lo que supone una herramienta fundamental en el consejo prenatal y, también en los últimos años, en la indicación del tratamiento prenatal, ya que nos informa sobre el grado de hipoplasia pulmonar que es el parámetro clave en el pronóstico de la enfermedad. La relación entre los perímetros del pulmón y cabeza fetales (LHR del inglés *lung to head ratio*) y la posición del lóbulo hepático izquierdo son los dos parámetros ecográficos primordiales que informan sobre este grado de hipoplasia. Se consideran marcadores de mal pronóstico la presencia de herniación hepática intratorácica y un índice LHR menor de 1, definiendo así los casos de peor pronóstico y, según los criterios actuales, los únicos candidatos a recibir terapias prenatales^{110,111}.

El inicio de los conocimientos sobre terapia fetal deriva del desarrollo del modelo quirúrgico ovino en los años 80 por el grupo americano de San Francisco liderado por Harrison en el que se investigaban los efectos de la reparación diafragmática intraútero¹¹²⁻¹¹⁴. Dichas técnicas quirúrgicas sobre el diafragma fueron abandonadas por su elevada mortalidad y se sustituyeron por el procedimiento PLUG^{115, 116} (acrónimo del inglés “*plug the lung until it grows*”), en el que se estimula el crecimiento pulmonar mediante la oclusión de la tráquea fetal a través de dispositivos (*plugs*) como clips o balones. Esta técnica, que en un principio se hacía mediante histerotomía, ha sido sustituida por los tratamientos fetoscópicos, menos agresivos, con menor riesgo de parto pretérmino y menor mortalidad, vigentes en la actualidad^{117, 118}.

En el intento de simular al máximo las condiciones fisiológicas pulmonares fetales, los procedimientos más modernos desarrollados a partir del año 2006, consisten en oclusiones traqueales temporales que luchan contra la hipoplasia pulmonar, actuando durante la ventana embrionaria de las fases pseudoglandular y canalicular del desarrollo pulmonar^{119, 120}. Junto a los efectos beneficiosos sobre la hipoplasia pulmonar, estos procedimientos han demostrado un aumento de la supervivencia a corto plazo en el grupo de pacientes con HDC de peor pronóstico¹²⁰⁻¹²³.

2.5. EVOLUCIÓN A LARGO PLAZO:

Además de los síntomas digestivos secundarios al RGE, a la malrotación intestinal o a cuadros adherenciales consecuentes a la propia intervención quirúrgica, estos pacientes presentan una morbilidad variada a lo largo de sus vidas que requiere un seguimiento clínico multidisciplinario a largo plazo^{90, 124-126}.

Las secuelas pulmonares son las más frecuentes, afectando a más del 50% de los casos de forma global, especialmente a aquellos niños tratados con ECMO o cuya corrección quirúrgica requirió de un parche protésico¹²⁷. Además de trastornos pulmonares restrictivos y broncodisplasia derivados de la hipoplasia pulmonar y de la oxigenoterapia intensiva durante el período neonatal¹²⁸, se han constatado problemas respiratorios obstructivos¹²⁹ que se podrían justificar por alteraciones estructurales de la vía aérea o anomalías de la innervación broncopulmonar^{130, 131}.

Varios factores como la enfermedad pulmonar crónica, tratamientos e ingresos prolongados o la existencia de RGE, justifican el elevado número de pacientes que presentan retrasos del crecimiento ponderal, necesitándose con frecuencia la realización de gastrostomías en pacientes con dificultades para la alimentación oral o como vía para la administración de nutrición enteral complementaria que favorezca la ganancia de peso^{132, 133}.

Hasta un 40% de los niños con HDC padecen algún tipo de defecto neurocognitivo, con mayor riesgo si fueron tratados con ECMO debido a las complicaciones neurológicas que esta técnica puede producir. Otros factores como malformaciones neurológicas asociadas, o la hipoxemia durante el período neonatal, explican la mayor incidencia de retraso psicomotor en los pacientes con HDC tratados con ECMO comparados con otros tratados con ECMO pero sin HDC¹³⁴⁻¹³⁷. Hasta en un 35% se han demostrado defectos de audición, siendo más vulnerables una vez más los enfermos tratados con ECMO^{134, 138}. La utilización de terapias ventilatorias intensivas o medicamentos ototóxicos pueden ser otras causas de esta sordera neurosensorial; pero el hecho de que no se haya demostrado esta sintomatología de forma significativa en otros pacientes tratados de forma similar sin HDC hace sospechar que estos defectos auditivos puedan ser consecuentes también a una malformación del oído interno, constituyendo una manifestación más de la enfermedad de causa aún desconocida¹³⁹.

Por último, las deformidades torácicas son también una secuela a vigilar en el seguimiento a medio y largo plazo. El maldesarrollo del diafragma y del pulmón, junto a los esfuerzos respiratorios intensos en la época neonatal, favorecen el desarrollo de *pectus excavatum* en numerosos casos. Asimetrías torácicas, deformidades escapulares o escoliosis de origen iatrogénico son otro tipo de defectos torácicos frecuentemente diagnosticados en estos pacientes^{126, 140}.

3. LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA EN ANIMALES. MODELO INDUCIDO CON NITROFEN.

3.1. GENERALIDADES:

Dentro de los modelos experimentales que reproducen la HDC en animales, el modelo inducido con el teratógeno nitrofen en roedores es el preferido y más utilizado a la hora de investigar los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad. Por un lado, permite la investigación de la HDC durante el desarrollo embrionario, desde su génesis y, por otro, reproduce fielmente en estos animales tanto la hernia como todo su complejo malformativo, tal y como se presenta en los humanos. Sin embargo, su mecanismo exacto de acción no es del todo conocido. El hecho de que la exposición al mismo teratógeno produzca múltiples alteraciones en diferentes órganos y tejidos y que las dosis utilizadas *in vitro* sean elevadas, debe hacernos ser precavidos a la hora de interpretar las observaciones sobre posibles efectos del nitrofen y su relación con la clínica y etiopatogenia en humanos⁵⁰.

Este modelo fue descrito por Iritani en 1984²⁰ y consiste en la administración del herbicida nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter) (Figuras 6 y 7) a ratas gestantes el día 9,5 de la gestación, dando lugar en una proporción variable de la descendencia a defectos diafragmáticos, hipoplasia pulmonar y al resto del espectro malformativo de esta enfermedad^{13, 27, 141}.

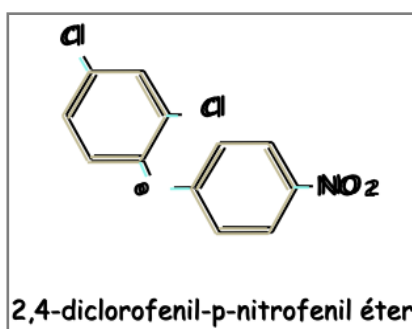


Figura 6.- Estructura química del herbicida nitrofen

El tratamiento con nitrofen en animales produce consecuencias diversas en función de varios factores. Así, la proporción de descendencia con HDC varía entre el 11%-80% dependiendo de la dosis administrada¹⁴², obteniendo el mayor porcentaje cuando se administra por vía enteral a la dosis de 100 mg/kg. En este sentido, también la especie de roedor utilizado influye en estos efectos, obteniendo mayor número de casos cuando los animales de experimentación son ratas de la especie Sprague-Dawley^{143, 144}. Por otro lado, la ventana embrionaria en la que el feto se expone al nitrofen influye claramente en la localización de la hernia y en el tipo de malformaciones que la acompañan²⁷. Cuando la exposición se realiza en estadios embrionarios tempranos (E9,5) la hernia es predominantemente izquierda¹⁴⁵ y las malformaciones cardiovasculares son los defectos asociados más frecuentes, del mismo modo que un retraso de 12h en la administración del teratógeno hace que las hernias sean predominantemente derechas^{12-14, 28, 146, 147}.

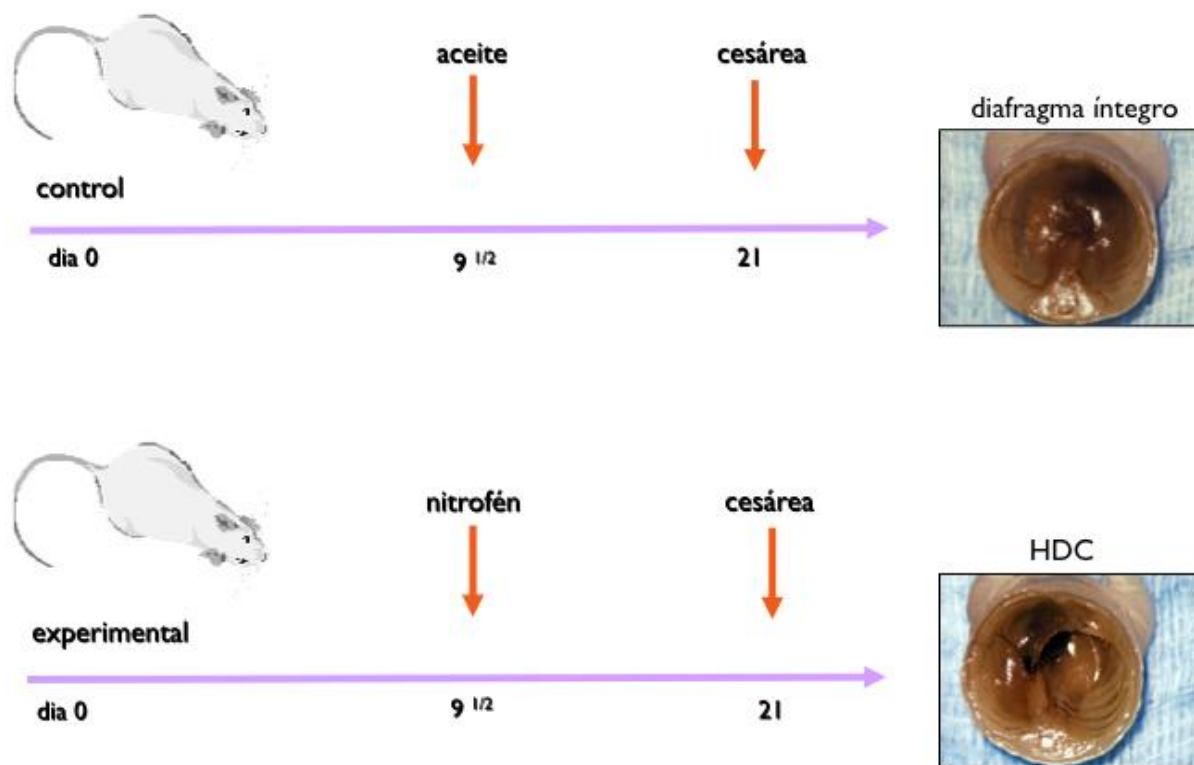


Figura 7.- Modelo de HDC inducida por nitrofen. La administración de nitrofen provoca con una frecuencia variable la aparición de hernia diafragmática, cuya lateralidad (derecha /izquierda) depende en gran parte del momento exacto en que se administra el herbicida. Se muestran cortes transversales torácicos que incluyen la región diafragmática de fetos de rata en el momento del nacimiento (día 21). En la foto superior se observa un diafragma normal, en un feto del grupo control. En la foto inferior, correspondiente a un feto expuesto a nitrofen, se aprecia la existencia de una hernia diafragmática izquierda.

3.2. EFECTOS DEL NITROFEN SOBRE EL PULMÓN:

Este modelo experimental se ha utilizado frecuentemente con el objetivo de conocer los posibles mecanismos que dan lugar a la hipoplasia pulmonar asociada a la HDC. Como ya se comentó en el apartado sobre la etiopatogenia, después de un debate que duró algunos años, ya parece claro que la hipoplasia del pulmón es un fenómeno primario que aparece incluso antes que el defecto diafragmático y que se agrava por la presencia de las vísceras abdominales en la cavidad torácica, fenómeno conocido como “the dual hit” hipótesis^{36, 39, 54, 148-150}.

El nitrofen produce a nivel pulmonar alteraciones en las células epiteliales y mensesquimales¹⁵¹, afectando a su proliferación y diferenciación mediante mecanismos mediados en parte por la expresión de factores de crecimiento (FGF10 y FGF7) en el parénquima pulmonar en desarrollo¹⁵². La alteración de la diferenciación pulmonar se manifiesta en la fase pseudoglandular como una disminución y retraso de la ramificación bronquial asociados a un aumento desproporcionado de los neumocitos tipo II con respecto al tipo I^{39, 153}.

Otros efectos del nitrofen incluyen alteraciones en el surfactante en forma de disminuciones en la expresión de sus proteínas (A, B y C) y de su porción lipídica, la fosfatidilcolina^{149, 154}, que podrían producirse a su vez por una disminución en la expresión de los factores de transcripción que regulan su síntesis, como el factor tiroideo de transcripción TTFI^{143, 150, 155}. En estas disminuciones en la síntesis de TTFI y en los defectos madurativos del surfactante pulmonar se han implicado mecanismos oxidativos por parte del nitrofen, al probarse, en parte, una reversión de estos efectos con la administración de vitaminas antioxidantes (vitaminas A,E y C)^{150, 156}. Sin embargo, el hecho de que en otras investigaciones sólo se hayan demostrado beneficios al administrar vitamina A (precursor del ácido retinoico) hace replantearse la hipótesis oxidativa¹⁵⁷.

3.3. ESPECTRO MALFORMATIVO:

La exposición en ratas gestantes al nitrofen reproduce las malformaciones asociadas descritas en humanos, proporcionando un modelo excelente para el estudio de este complejo malformativo. Caben destacar las malformaciones cardiovasculares que afectan a la septación cardíaca y a la disposición definitiva de los grandes vasos arteriales, hipoplasia miocárdica^{12, 13, 146, 158}, anomalías de glándulas del cuello derivadas de los arcos faríngeos como hipoplasia, ectopia o ausencia del timo o las glándulas paratiroides¹⁴, y malformaciones esqueléticas que afectan al esqueleto axial y paraaxial (hendiduras vertebrales, ausencia o aumento en el número de costillas, fusión costal o espina bífida)⁴⁰.

Más recientemente, han sido descritas por nuestro grupo otras alteraciones como un empobrecimiento de células C tiroideas (productoras de calcitonina y reguladoras por lo tanto de los niveles de calcio en el organismo)¹⁵⁹ y alteraciones en la innervación autónoma esofágica^{81, 160} y traqueobronquial^{131, 161} en estos animales.

Todas estas malformaciones tienen en común su origen embrionario en la CN¹⁴, y algunas aparecen en otras enfermedades también de probable naturaleza neurocristal como la atresia de esófago¹⁶² o el síndrome de DiGeorge¹⁶³, lo que habla del papel primordial de la CN en el espectro malformativo asociado a la HDC, punto que se desarrolla más adelante.

3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DEL NITROFEN:

Se han descrito una variedad de posibles vías mediante las cuales el nitrofen produce sus efectos sobre el diafragma, el pulmón y el resto de órganos que se alteran dentro del espectro malformativo en la HDC experimental. Hemos hablado anteriormente de la disminución en la síntesis de algunos factores de crecimiento y en la alteración en la expresión de determinados factores de transcripción causados por el teratógeno. Otros autores han sostenido también un aumento de la apoptosis celular, aunque con resultados contradictorios¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Además, la similitud estructural del nitrofen con la hormona tiroidea podría interferir con el receptor de ésta, ocasionando así por mecanismos desconocidos el espectro malformativo^{143, 155}.

La vía más aceptada hoy para explicar el mecanismo de acción del nitrofen tiene que ver con la secuencia metabólica del ácido retinoico (Figura 8). Las modificaciones en esta vía han sido demostradas tanto en humanos como en animales^{22, 27}, y se sustenta en hallazgos que demuestran que los pasos metabólicos desde vitamina A a retinal, y a su producto activo, el ácido retinoico, están alterados en la HDC^{27, 50, 90}.

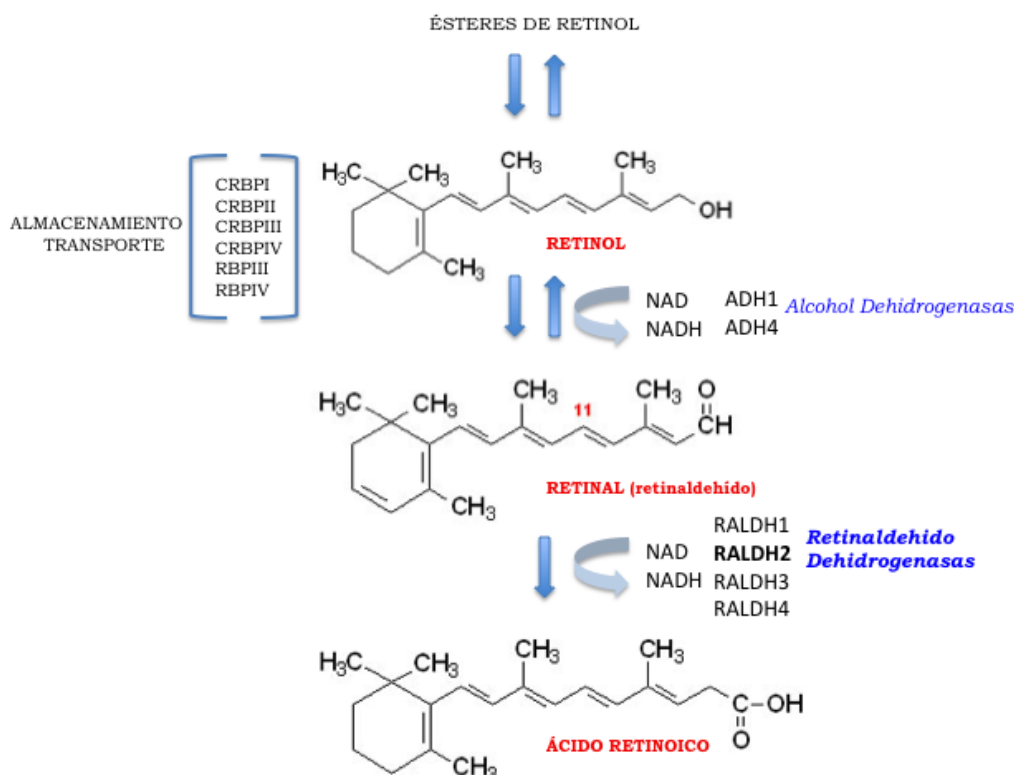


Figura 8.- Metabolismo del retinol (vitamina A). Los ésteres del retinol se almacenan en el hígado y se transforman en retinol por hidrólisis. El retinol unido a su proteína transportadora (RBP4) se transporta a los tejidos periféricos. En los tejidos diana se oxidan a retinaldehído por la acción de las enzimas *alcohol dehidrogenasas* y a ácido retinoico por las *retinal dehidrogenasas*. El ácido retinoico se une a sus receptores nucleares (RAR) e induce la transcripción génica para la expresión de diferentes proteínas.

Algunos datos que apoyan esta teoría se conocen desde antiguo. Así, desde los años 50 del pasado siglo se sabe que ratas deficientes en vitamina A tienen descendencia con HDC^{34, 168}, malformación que puede prevenirse con la administración de vitamina A durante la gestación⁴⁶. Por otra parte, ratones mutantes para receptores del ácido retinoico (RAR) tienen hipoplasia pulmonar y en ocasiones HDC junto con otras malformaciones^{23, 49}. Además se ha demostrado que los niveles sanguíneos de retinol están disminuidos en recién nacidos con HDC²⁵ y en el parénquima pulmonar de las ratas con HDC⁴⁸, a la vez que las enzimas implicadas en la síntesis de AR están alteradas en ellas^{48, 51}. En concreto, la enzima *retinaldeshidrogenasa 2 (RALDH2)*, limitante de la síntesis de AR está disminuida en cultivos celulares de ratas expuestas a nitrofen y a otros teratógenos capaces de producir HDC^{52, 53, 169}. Finalmente, explantes de pulmones hipoplásicos de fetos de ratas expuestos a nitrofen recuperan el desarrollo pulmonar cuando se

les añade al medio de cultivo AR⁵⁵ y lo mismo ocurre cuando fetos expuestos a nitrofen son tratados prenatalmente con ácido retinoico^{170, 171} (Figura 9).

Por último, el nuevo modelo de HDC inducida con un fármaco pan antagonista de los RAR (el BMS493) confirma que la vía del AR está implicada en la etiopatogenia de este modelo experimental¹⁷².

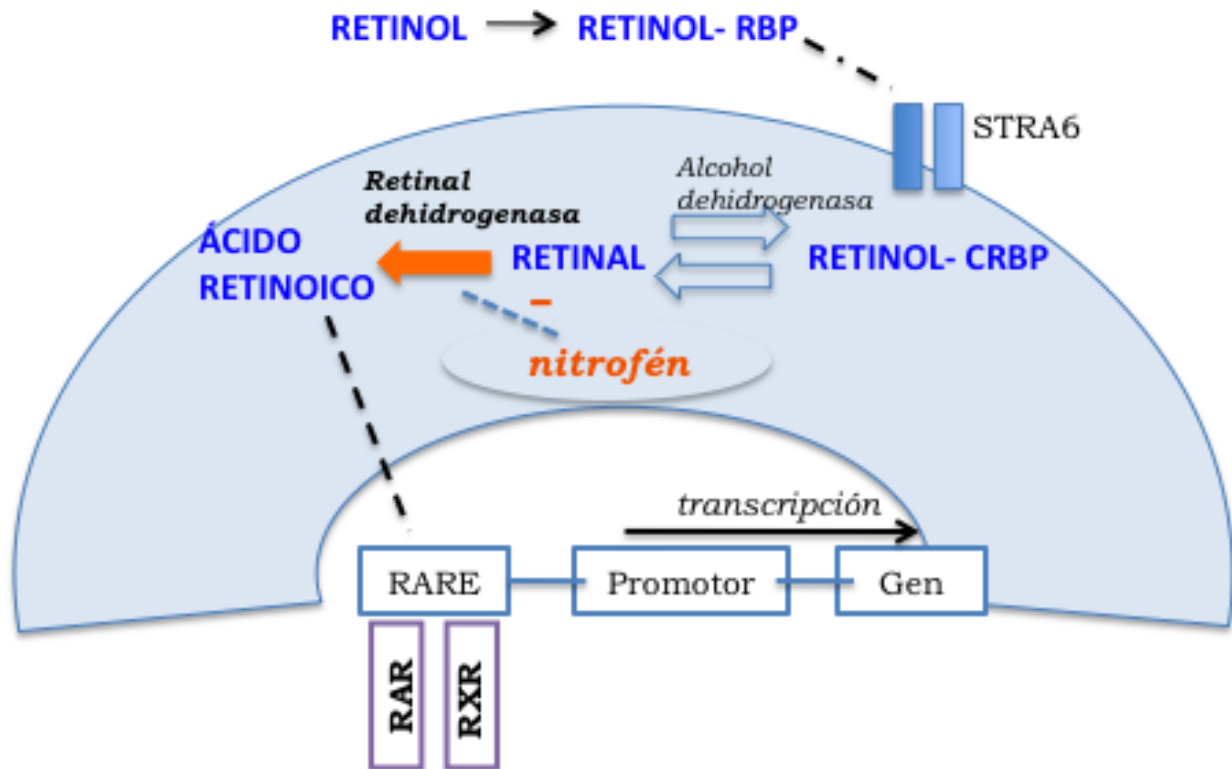


Figura 9. Vía genética del retinol. El receptor de membrana STRA6 se une a la proteína transportadora del retinol (RBP) lo que permite la captación (entrada) intracelular del retinol. Éste se une a su proteína transportadora celular en el citoplasma (CRBP) y es convertido a retinaldehído (retinal) por la acción de la alcohol dehidrogenasa en una reacción enzimática reversible. Posteriormente, la enzima retinal dehidrogenasa (RALDH) transforma el retinaldehído en ácido retinoico en un proceso no reversible. En el núcleo, el ácido retinoico se une a su receptor (RAR), lo que desencadena una secuencia de transcripción génica. El receptor del ácido retinoico forma un heterodímero con el receptor X retinoides (RXR) y se une al “elemento de respuesta del ácido retinoico” (RARE) de la región promotora de un gen determinado para iniciar su transcripción. Imagen modificada de: Noble, 2007⁵⁰.

4. LA CRESTA NEURAL

4.1. GENERALIDADES:

La cresta neural (CN) es una estructura embrionaria transitoria originada a partir del neuroectodermo durante la formación del tubo neural en la tercera y cuarta semanas de la gestación humana. Se origina a partir de las células neuroectodérmicas localizadas en la porción más lateral de los pliegues neurales, fusionándose en la línea media entre el tubo neural y el ectodermo superficial (Figura 10).

Dado que es un componente característico de los animales vertebrados y debido a su importancia filogenética, ha sido objeto frecuente de estudio no sólo en el ámbito de la medicina sino también por anatomistas o biólogos¹⁷³⁻¹⁷⁵. Sus células tienen la capacidad de diferenciarse en multitud de estirpes celulares, participando en los procesos de organogénesis durante el desarrollo embrionario.

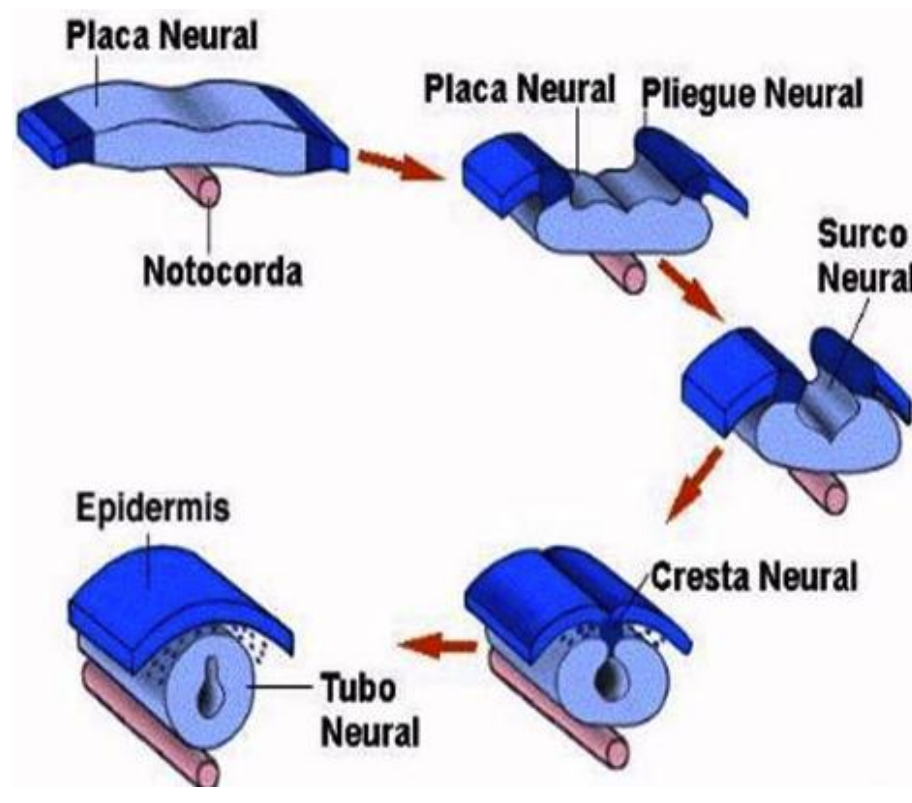


Figura 10.- Proceso de neurulación (3ºSDG). Formación del tubo neural a partir del ectodermo que forma el surco neural en la línea media. La interacción entre el ectodermo epidérmico y la placa neural da lugar a la formación de los pliegues neurales que cuando se fusionan en la línea media forman la cresta neural. Tomado de neurocienciasunamfesi.blogspot.com.

Tal y como se ha explicado en apartados previos, la correcta función de la CN es regulada por mecanismos de carácter genético, por señales moleculares del tipo de factores crecimiento y de transcripción y mediante sustancias bioquímicas como el AR o sus metabolitos^{27, 43}. Un funcionamiento anómalo de cualquiera de estos mecanismos contribuye al maldesarrollo del diafragma, a la inmadurez del pulmón y al origen de la multitud de malformaciones asociadas a la HDC^{14, 43}.

4.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS:

La CN fue descrita en 1868 por el anatomista suizo Wilhelm His (1831-1904) que la asoció al origen del sistema nervioso en los embriones vertebrados. Se definió entonces como una estructura situada entre el ectodermo precursor de la epidermis y el tubo neural, de la que derivarían los ganglios espinales y craneales. El término “cresta neural” no se definió hasta 10 años más tarde en un trabajo sobre el desarrollo de los nervios craneales en las aves publicado por Arthur Milnes Marshall¹⁷⁶. Hubo que esperar otro medio siglo para demostrar que de la CN, además de la estirpe nerviosa, se originaban otras células y tejidos como el cartílago o el tejido conectivo¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

A partir de los años 60 se avanzó de forma importante en los estudios sobre la diferenciación de las células de la CN y se definió su disposición característica a lo largo del eje craneocaudal del embrión. Se dividió entonces en cresta neural craneal (CNC) y cresta neural troncal (CNT)^{174, 181, 182}. Se demostró también que las células neurocristales tenían patrones de diferenciación tisular y vías migratorias características en función de su localización topográfica dentro de la CN¹⁸³. Es decir, su diferenciación estaba en parte “predeterminada” según su localización en el embrión^{176, 184-186}.

A la vez que se investigaba sobre el desarrollo y función de las células de la CN, se identificaron aquellas situaciones patológicas derivadas de su mal funcionamiento, definiéndose por primera vez en 1974 el concepto de neurocristopatía como aquella enfermedad caracterizada por la afectación de órganos o tejidos procedentes de la CN^{187, 188}.

En cuanto a los animales de experimentación, se desplazó progresivamente el estudio en anfibios hacia las investigaciones en las aves, siendo de vital importancia los trabajos sobre ablación y trasplante de regiones concretas de CN en el modelo de quimera de pollo y codorniz desarrollado por Le Dourain^{179, 189}, y que supuso el pilar básico en el estudio de la CN^{186, 190}. Posteriores a estos trabajos pioneros, los experimentos consistentes en la ablación y trasplante de regiones concretas de CN en ratas, el desarrollo de técnicas de explante y cultivo celular y tisular y la utilización de marcadores moleculares y genéticos han sido fundamentales para el conocimiento de su papel en el desarrollo murino y de los vertebrados en general¹⁹¹⁻¹⁹⁵.

En los últimos años se han descrito múltiples mecanismos que regulan la organogénesis mediada por la CN, tomando especial interés el estudio de los genes homeóticos o genes Hox. Estos genes codifican el eje axial anteroposterior de los animales bilateralmente simétricos y se expresan de diferente forma en las distintas regiones de la CN lo que ha contribuido al mapeo detallado de su estructura^{60, 62, 196-198}. Otros genes expresados en el ectodermo (*Wnts*), en la placa neural (*Zic*, *Pax3*, *Pax7*) o en los pliegues neurales (*Msx1*, *Msx2*) se han demostrado también implicados en el desarrollo de la CN¹⁷⁵.

4.3. FORMACIÓN, MIGRACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CN:

Aunque son bien conocidos los aspectos sobre migración y diferenciación tisular de la CN en vertebrados, los mecanismos exactos sobre su origen no se han esclarecido aún. El concepto de que sus células son una población “inducida” es una teoría ampliamente aceptada en la actualidad gracias a los estudios realizados en anfibios y aves mediante extirpación y trasplante de zonas concretas de CN o el marcaje de las células con marcadores específicos como HNK1. Estos estudios señalan el origen de las células de la CN en estímulos procedentes de la interacción entre la placa neural y el ectodermo no neural o epidérmico, estímulos que podrían inducir la aparición de estas células en las porciones laterales de los pliegues neurales^{184,192, 199-202}.

Esta formación podría además estar favorecida por el microambiente extracelular mediante factores de crecimiento como el FGF o miembros de la familia TGF- β (dorsalina-I o proteínas morfogenéticas del hueso BMP-4 y BMP-7)²⁰³, que en unas cantidades adecuadas y en determinados estadios embrionarios inducirían la formación de células neurocristales y su diferenciación en distintos órganos y tejidos²⁰⁴⁻²¹⁰.

Esta capacidad pluripotencial de la CN ha contribuido a que en los animales craneados se la haya considerado como una cuarta hoja germinal^{176, 211} capaz de formar tejido neural, esquelético o conjuntivo y que se añadiría a las tres hojas germinales tradicionales: ectodermo, mesodermo y endodermo. De esta forma, existirían dos hojas germinales primarias, el ectodermo y el endodermo, presentes en las primeras fases del desarrollo embrionario, y dos hojas secundarias, mesodermo y CN, que requieren de la interacción del ectodermo y endodermo para su aparición¹⁷⁴.

Una vez formada la CN, sus células sufren una transformación de epitelial a mesenquimal durante su fase migratoria, que está determinada tanto por las características intrínsecas de éstas (se trata de alguna manera de células “programadas”), como por el microambiente por el que se desplazan. Así, bajo la influencia de señales moleculares como determinados factores de transcripción, las células neurocristales pierden moléculas de adhesión celular como N-CAM y N-cadherina, características de las células del tubo neural, y se diferencian en la estirpe celular definitiva¹⁸². También una matriz extracelular “favorecedora” rica en fibronectina, laminina y colágeno tipo IV influye en el establecimiento de las distintas vías migratorias desde la CN y en la diferenciación de sus células²¹²⁻²¹⁴.

Además de la localización topográfica de las células neurocristales según una situación cefálica (*Cresta Neural Craneal*) o más caudal (*Cresta Neural Troncal*), también es determinante de su diferenciación final el momento en el que inician sus desplazamientos. De este modo, las células que migran en primer lugar tienen la capacidad de diferenciarse en muchas estirpes celulares y sin embargo, las que migran más tardíamente lo hacen en localizaciones más dorsales y sólo tienen capacidad para diferenciarse en células pigmentarias¹⁸².

La CN participa en el desarrollo de múltiples estructuras, tejidos y órganos. De ella derivan varios componentes del sistema nervioso como ganglios sensoriales de los nervios raquídeos y de los pares craneales V, VII, IX y X, ganglios del sistema nervioso autónomo, sistema nervioso entérico, las vainas de los nervios periféricos y las cubiertas meníngeas del encéfalo y la médula espinal (piamadre y aracnoides). También participa en el desarrollo de los componentes musculoesqueléticos de la cabeza y del cuello, de las estructuras derivadas de los arcos faríngeos: timo, tiroides, paratiroides y corazón; o de la médula suprarrenal, entre otros órganos y tejidos, como se describe en las figuras 11 y 12.

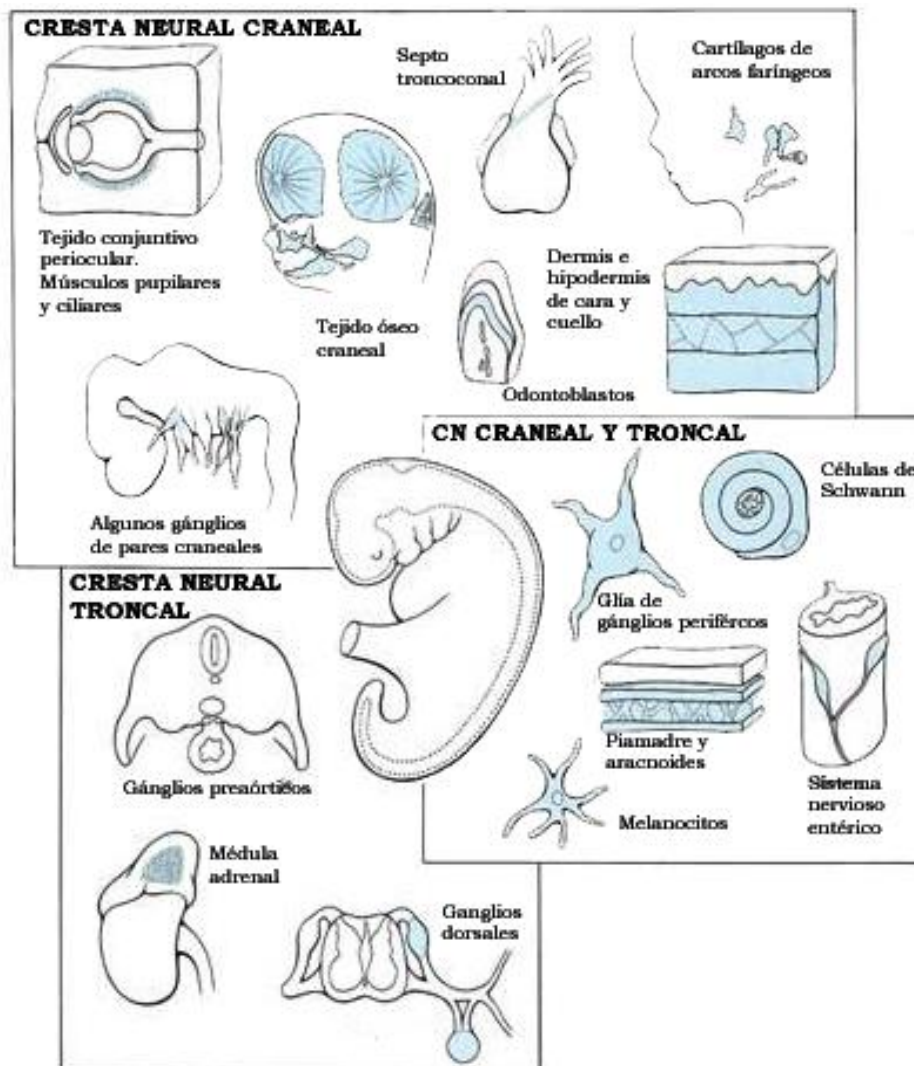


Figura 11.- Esquema que muestra las estructuras y órganos derivados de la migración y diferenciación de las células de la Cresta Neural. De la CNC derivan células ectomesenquimales que formarán tejido conectivo, óseo o cartilaginoso que formarán el esqueleto craneofacial, los cartílagos de los arcos faríngeos y su tejido mesodérmico; así como el mesénquima del septo troncoconal. También darán lugar a células nerviosas en distintas localizaciones. Las células originarias de la CNT se diferencian exclusivamente en células de estirpe nerviosa o pigmentaria. Tomado de Larsen 2003 ²¹⁵.

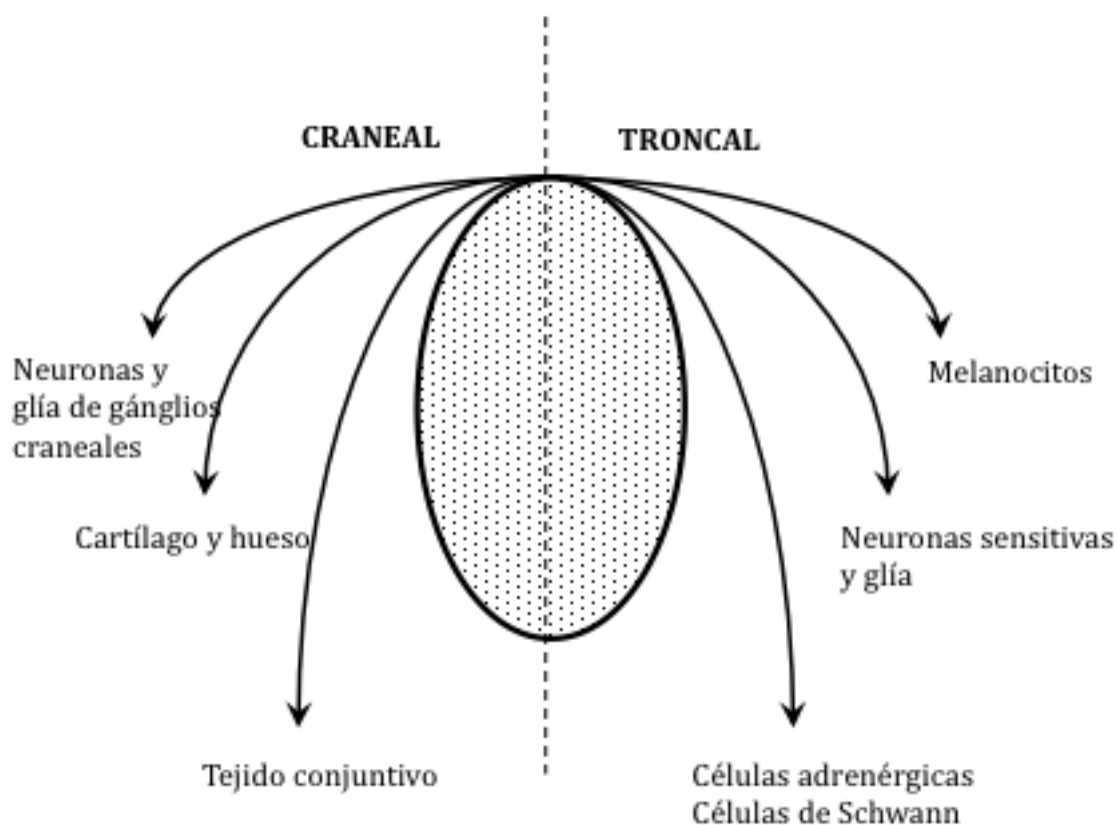


Figura 12.-Esquema explicativo de la diferenciación de las células de la Cresta Neural Craneal y Cresta Neural Troncal. Como puede observarse, el tejido mesenquimal deriva sólo de las células procedentes de la CNC. Además de la localización (CNC o CNT), el tipo de diferenciación celular depende también del momento en el que migran las células desde la CN, como se ha comentado en el texto.

4.4. LA CRESTA NEURAL CRANEAL (CNC):

En las aves, la CNC se localiza desde el mesencéfalo hasta el nivel del 5° somito. Contribuye a la formación de tejido, cartílago y hueso del esqueleto craneofacial, el corazón, los odontoblastos, y las neuronas y células gliales de los ganglios de los pares craneales^{174, 176, 184}

Las células que migran desde los rombómeros r1, r2 y r4 se sitúan proximales a la placoda ótica y se dirigen al proceso frononasal y a los arcos faríngeos 1° y 2° para formar el esqueleto del tercio superior de la cara, el maxilar, la mandíbula, los huesos del oído y el cartílago hioideo^{182, 186}. Las células procedentes de los rombómeros r6, r7, r8 y de los somitos 1-5 (todas distales a la placoda ótica) migran hacia los arcos faríngeos 3°, 4° y 6° participando en el desarrollo del timo, tiroides y paratiroides. Desde allí, algunas células migran a su vez hacia el corazón en desarrollo para participar en la septación e inervación cardíacas; éstas son las células de la CN cardíaca, que describimos más adelante en el apartado del desarrollo cardiovascular.

En los somitos 1-7 se encuentran también las células de la CN Vagal, que migran hacia el intestino y se diferencian en los ganglios parasimpáticos entéricos¹⁷⁴.

Los rombómeros r3 y r5 tienen unas características especiales ya que la producción de sus células y su migración está muy limitada, no mostrando vías migratorias específicas ni estructuras diana en qué diferenciarse. Esto se debe a una apoptosis segmentaria específica por la liberación de moléculas como *Bmp-4* o inhibidores de la migración celular como *Colapsina-1-c* y *Sema3A*²¹⁶⁻²¹⁸. Este comportamiento especial de los rombómeros 3 y 5 producirá como efecto final una adecuada diferenciación de los arcos branquiales.

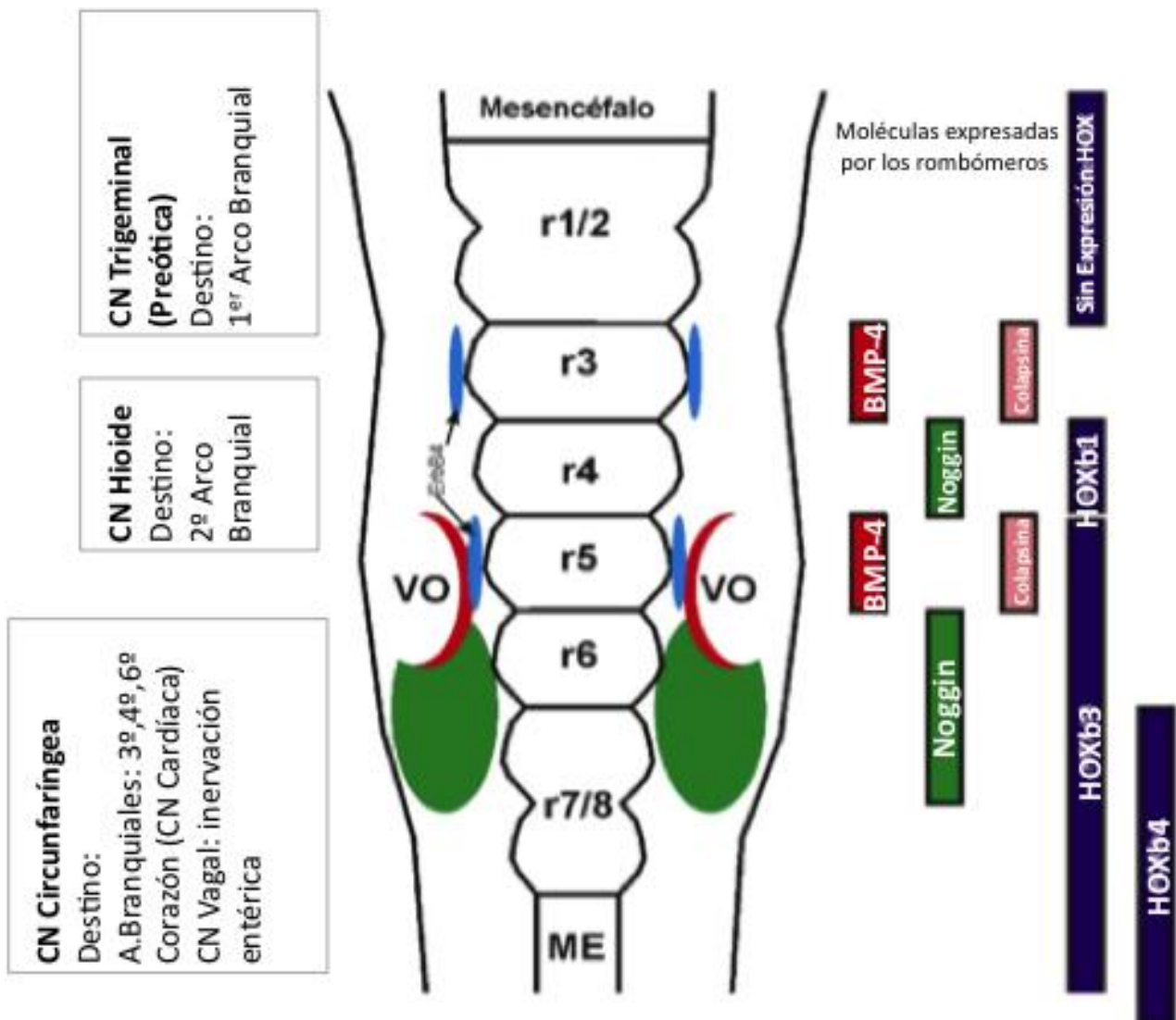


Figura 13.-Esquema que muestra el desarrollo del romboencéfalo y de la CN Craneal. La CN (parte izquierda de la figura); se divide en tres regiones en función de sus vías migratorias. En la porción central de la figura se muestra la expresión de moléculas en los tejidos vecinos del romboencéfalo. A la derecha, algunas moléculas expresadas por los rombómeros y la expresión de los genes HOX. **BMP-4**: molécula apoptótica de la CN. **Noggin**: molécula anti-apoptótica. **ErbB4** y **Colapsina**: inhibidores de la migración de la CN. Tomado de Duque-Osorio 2003 219

En los mamíferos, las células de la CN craneal migran antes del cierre completo del tubo neural a unas estructuras precursoras de los rombómeros específicas, los *prorrombómeros* A (*proRA*: futuros r1 y r2), B (*proRB*: futuros r3 y r4), C (*proRC*: futuros r5 y r6) y D (*proRD*: r7). Así, las células procedentes de *proRA* migrarán al primer arco faríngeo, las del *proRB* al segundo arco y las de los prorrombómeros más caudales (*proRC* y *proRD*) se desplazarán hacia el tercer y posteriores arcos faríngeos²²⁰.

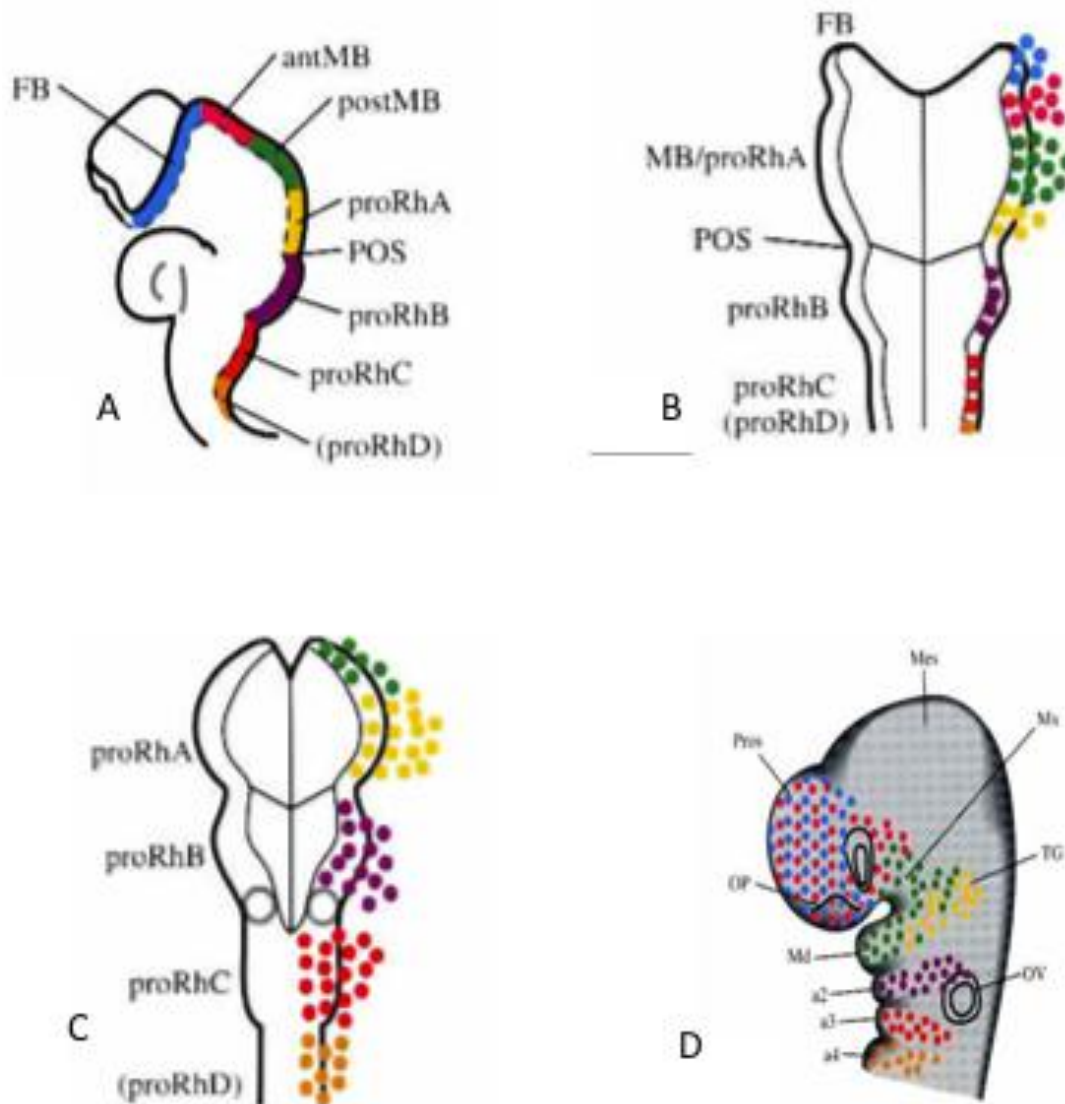


Figura 14.- Migración de las células de la CN Craneal en los periodos correspondientes a 5-6 somitas (A y B), 8 somitas (C) y período faríngeo (D). **FB:** forebrain (prosencéfalo). **MB:** midbrain (mesencéfalo). **POS:** postótica. **a1:** primer arco branquial. **a2:** segundo arco branquial. **a3:** tercer arco branquial. Tomado de Osumi-Yamashita, 1997²²⁰

4.5. LA CRESTA NEURAL DEL TRONCO (CNT):

Se sitúa entre el 6° somito y los somitos más caudales. Se diferencia en tejido nervioso y en melanocitos. Sus células siguen dos rutas migratorias, ventrolateral y dorsolateral. Las que siguen la primera darán lugar a los ganglios sensitivos raquídeos del cuello, tronco y extremidades, los ganglios simpáticos, las neuronas paraaórticas, las células de la glía, células de Schwann y las células cromafines de la médula suprarrenal. Cuando proceden de los somitos 6° y 7° originarán la inervación parasimpática entérica junto a las células neurocristales de la CN Vagal, si son de los somitos 8 a 27 se diferenciarán en neuronas adrenérgicas y, por último, aquellas caudales al somito 28 (conocidas como CN sacra) se diferenciarán en tejido nervioso entérico del intestino distal. Las células de la CN que siguen la ruta dorsolateral se diferenciarán en melanocitos. En los dos apartados siguientes analizaremos dos de las estructuras más importantes derivadas de la CN craneal: el aparato faríngeo y el sistema cardiovascular.

4.6. EL APARATO FARÍNGEO:

4.6.1. GENERALIDADES:

En este apartado describimos el desarrollo de los órganos y tejidos craneocervicales que se originan a partir del endodermo, ectodermo y mesodermo faríngeos. Estas tres hojas germinales forman el *aparato faríngeo* a ambos lados del intestino anterior en la región cervical, proceso vital en el desarrollo del esqueleto craneofacial, de las principales glándulas cervicales (timo, tiroides y paratiroides) y de la formación de los grandes vasos del cuello y del tórax. Su desarrollo depende de una correcta influencia organogenética por parte de la CN, lo que lo convierte en un componente embrionario característico y exclusivo de los animales vertebrados.

En los peces y anfibios larvarios, el aparato faríngeo sostiene las branquias y tiene una función respiratoria en el intercambio de O_2 y CO_2 entre la sangre y el agua, de ahí el nombre de aparato branquial. Sin embargo en los vertebrados más evolucionados carentes de branquias, este sistema no cumple esta función respiratoria por lo que es preferible la denominación de aparato faríngeo^{218, 221}. Dicho aparato faríngeo se divide en tres componentes principales: arcos, bolsas y hendiduras faríngeas (Figura 15).

En la confluencia de los epitelios de las bolsas y las hendiduras faríngeas se forman las *membranas faríngeas*, que salvo la primera que originará el tímpano, desaparecen durante el período embrionario.

Los *arcos faríngeos* forman el esqueleto y los componentes muscular y nervioso de las regiones de la cabeza y el cuello. Son 5 crestas sobreelevadas y redondeadas que empiezan a desarrollarse a partir de la cuarta semana de gestación a cada lado de las futuras regiones de la cara y el cuello.

Las *bolsas faríngeas* se componen de 5 pares de divertículos a cada lado de la faringe primitiva, que se desarrollan en una secuencia craneocaudal entre los arcos faríngeos. Dan lugar a las principales glándulas cervicales: timo, tiroides y paratiroides.

Las *hendiduras faríngeas* son los cuatro surcos que separan externamente los arcos faríngeos. El primer par de hendiduras origina el conducto auditivo externo. Las tres restantes confluyen en una hendidura mayor: el “*seno cervical*”, que normalmente involuciona a lo largo de la gestación. La duplicación de la primera hendidura faríngea da lugar a las *fistulas preauriculares*, tapizadas por endodermo en la región ventral del conducto auditivo externo. La persistencia del seno cervical origina los *quistes* y las *fistulas cervicales*.

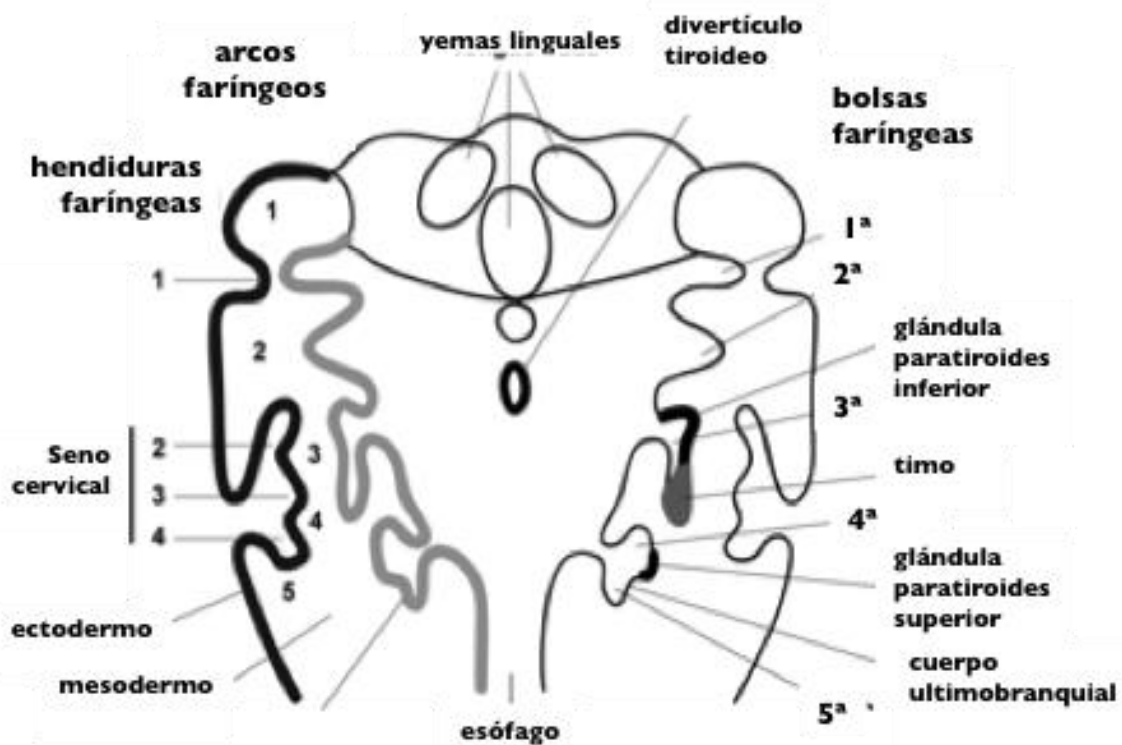


Figura 15.- Esquema del aparato faríngeo de un embrión mamífero en un corte transversal en el que se representan las bolsas, hendiduras y arcos faríngeos. Del endodermo de la 3ª y 4ª bolsas faríngeas se originan las glándulas paratiroides y el timo durante la 5ª SDG en el embrión humano. Puede observarse cómo las glándulas paratiroides superiores se originan de la 4ª bolsa faríngea, más caudal que las glándulas paratiroides inferiores, que proceden del endodermo de la 3ª bolsa. El cuerpo ultimobranchial, que dará lugar a las Células C tiroideas productoras de calcitonina, proceden de la 5ª bolsa faríngea (para algunos autores, región más caudal de la 4ª bolsa). Modificado de Moore, 2004 ³²

4.6.2. LOS ARCOS Y BOLSAS FARÍNGEAS EN EL EMBRIÓN HUMANO:

Los arcos faríngeos comienzan a desarrollarse en la cuarta semana de gestación cuando las células de la CN migran hacia las futuras regiones de la cabeza y el cuello. Se desarrollan cinco arcos en dirección cefalocaudal, siendo visibles cuatro pares de arcos al final del primer mes del desarrollo embrionario. Están formados por un núcleo de mesénquima que se invade progresivamente por células de la CN, tapizado internamente por endodermo, y externamente por ectodermo^{218, 221}.

Contribuyen a la formación de los músculos, nervios, vasos arteriales y sostén cartilaginoso y óseo de las regiones facial y cervical a través de sus distintos componentes mesodérmicos:

- * un *arco aórtico* que irriga cada arco y se dirige a la aorta dorsal. Los arcos aórticos se transformarán en las principales arterias de la cabeza y el cuello y se describirán en el apartado posterior dedicado al desarrollo del sistema cardiovascular.
- * un *componente muscular* estriado que dará lugar a músculos de la cabeza y el cuello.
- * un *nervio* que inerva la mucosa y los músculos de cada arco, y
- * cartílago que formará el esqueleto de cada arco faríngeo.

Este desarrollo cefalocaudal de los arcos faríngeos depende de las vías migratorias segmentarias que se establecen desde el tubo y la CN, definiéndose tres rutas principales (Figura 13):

- 1.-Vía Trigeminal o Preótica: migra desde la parte caudal del mesencéfalo y la parte cefálica del romboencéfalo (r1 y r2) hacia el primer arco
- 2.-Vía Hioidea: coloniza el segundo arco desde el rombómero 4, y
- 3.-Vía Postótica o Circunfaríngea: desde los rombómeros 6 y 7 hacia los arcos branquiales caudales (arcos 3°, 4° y 6°).

Las estructuras derivadas de estos arcos faríngeos se describen a continuación y se resumen en la Tabla 2.

El primer arco faríngeo, llamado también arco mandibular, se compone de dos regiones: la prominencia maxilar, que da lugar al maxilar superior, el hueso cigomático y la porción escamosa del hueso temporal, y la prominencia mandibular, que dará lugar al maxilar inferior. El cartílago de este primer arco, el cartílago de Meckel, se osifica para formar la mandíbula y parte el martillo y el yunque del oído medio. La porción muscular da lugar a los músculos de la masticación. La inervación de este primer arco corre a cargo del V PC, el nervio Trigémico.

El segundo arco faríngeo, el arco hioideo, se compone de células cartilaginosas englobadas en el cartílago de Reichert y que darán lugar al estribo, la apófisis estiloides del hueso temporal, el asta menor y la porción superior del hioides. Los derivados musculares originan los músculos de la expresión facial, del estribo, el estilohioideo y parte del digástrico. Las células de estirpe nerviosa formarán la porción correspondiente del séptimo par craneal, el nervio Facial, encargado de la inervación de todas estas estructuras del 2º arco.

En el tercer arco faríngeo, el componente cartilaginoso completa la formación del hioides, en concreto de su asta mayor y de la porción inferior del cuerpo hioideo. Su derivado muscular es el músculo estilofaríngeo y la innervación dependerá del noveno par craneal, el nervio glosofaríngeo.

En el cuarto y sexto arcos, los derivados cartilaginosos forman los cartílagos laríngeos excepto la epiglotis. Los derivados musculares dan lugar a la lengua y los músculos de la deglución, vocalización y fonación (cricotiroideo, elevador del velo del paladar, constrictores de la faringe y los músculos intrínsecos de la laringe). Su innervación pertenece al décimo par craneal, el nervio vago.

El quinto arco en el humano involuciona, cuando existe, es rudimentario y no suele tener cartílago.

El primer par de bolsas faríngeas contribuye al desarrollo de la membrana y cavidad timpánicas, antro mastoideo y la trompa auditiva. El segundo par forma las amígdalas palatinas. La tercera bolsa faríngea da lugar al timo y las glándulas paratiroides inferiores y es la más relacionada con la organogénesis de la CN. La cuarta bolsa formará los esbozos de las glándulas paratiroides superiores a partir de la 5ª SDG; en su migración se quedan en una posición superior en los lóbulos tiroideos. Por último, la quinta bolsa, considerada por algunos autores como la porción ventral y caudal de la cuarta, originará los dos cuerpos ultimobranquiales, que al migrar hacia la región dorsal del tiroides se diferenciarán en las células C tiroideas (llamadas parafooliculares) (Figura 17), productoras de calcitonina. En los dos apartados siguientes desarrollaremos de forma independiente la anatomía y fisiología de estas estructuras.

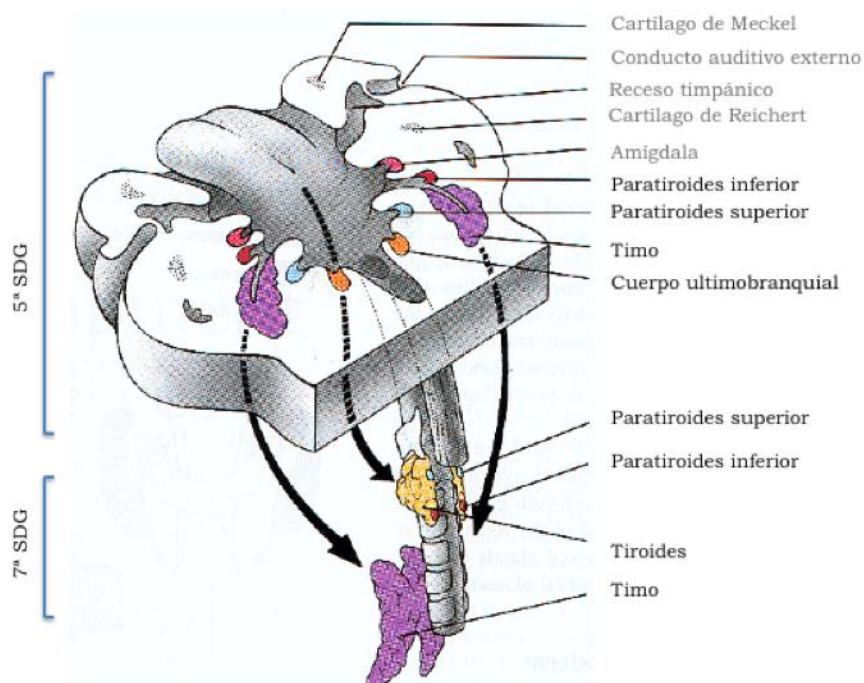


Figura 16.- Estructuras derivadas de las bolsas faríngeas. El receso tubotimpánico deriva de la primera bolsa faríngea, las amígdalas palatinas de la segunda; el timo y las glándulas paratiroides inferiores de la tercera y las glándulas paratiroides superiores de la cuarta bolsa faríngea. El cuerpo ultimobranquial, origen de las células C tiroideas, y procede de la región caudal de la cuarta bolsa faríngea o de una hipotética 5ª bolsa. Tomado de Larsen, 2003 ²¹⁵

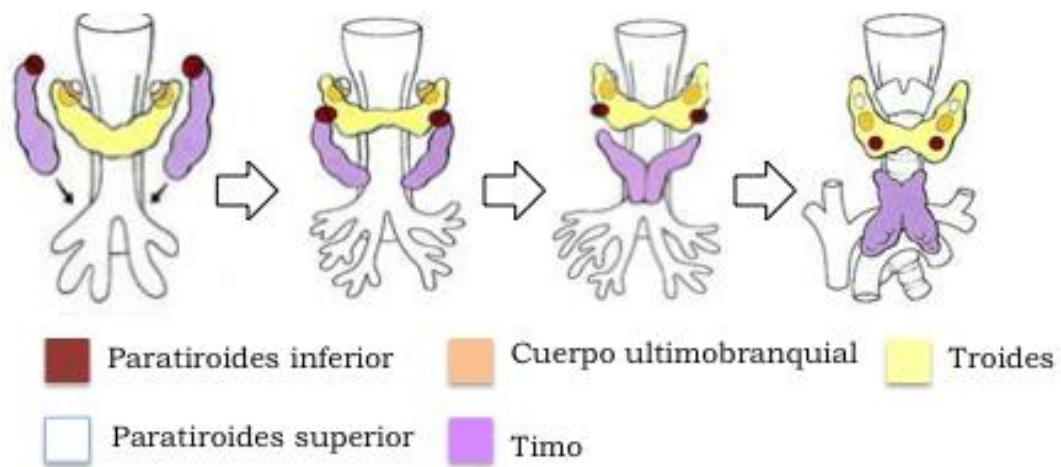


Figura 17.- Las glándulas paratiroides, el esbozo tímico y los cuerpos ultimobranquiales se separan del revestimiento de la faringe y se desplazan a sus localizaciones definitivas en el cuello y tórax. Las glándulas paratiroides y los cuerpos ultimobranquiales migran caudalmente hasta integrarse en la cara posterior de la glándula tiroidea. Las dos paratiroides intercambian su posición al migrar: la paratiroides derivadas de la 3ª bolsa faríngea se posiciona en un nivel más inferior, correspondiendo a las glándulas paratiroides inferiores, mientras que las derivadas de la 4ª bolsa faríngea se convierten en las glándulas paratiroides superiores.

Tomado de Larsen, 2003 ²¹⁵

Arco	Nervio	Músculos	Huesos/Cartílago
1º Mandibular	PC V	m. masticación Milohioideo Digástrico	Martillo/Yunque
2º Hiodeo	PC VII	m. expresión facial Estribo Estilohioideo Digástrico	Estribo Apófisis estiloides Asta menor hioides Cuerpo hioides (superior)
3º	PC IX	Estilofaríngeo	Asta mayor hioides Cuerpo hioides (inferior)
4º y 6º	PC X Rama laríngea superior Rama laríngea recurrente	Cricotiroideo Elevador velo paladar Constrictores faríngeos m. intrínsecos laríngeos m. estriados esófago	Cartílago tiroideo Cartílago cricoides Cartílago aritenoides Cartílago corniculado Cartílago cuneiforme

Tabla II.- Estructuras derivadas de los arcos branquiales. Los cartílagos del primer, segundo y tercer arco derivan del mesodermo paraaxial colonizado por las células de la Cresta Neural. Sin embargo, los derivados del cuarto y sexto arcos faríngeos parecen derivar del mesodermo lateral, no relacionado con la CN.

4.6.3. EL TIMO, LOS LINFOCITOS T Y LAS CÉLULAS C:

El Timo se origina como dos proliferaciones endodérmicas huecas que al invadir el estroma subyacente se transforman en cordones sólidos. Entre la 4ª y 7ª SDG pierden su conexión con la faringe y migran inferiormente a ambos lados del cuello hasta fusionarse medialmente en una localización inferior al tiroides en la cara dorsal del esternón. Queda así como una glándula bilobulada constituida por una corteza y una médula bien definidas al final del período embrionario (12ª SDG)^{215, 221}.

A partir de este momento, se poblará de linfocitos procedentes de células madre del saco vitelino, del eplon y del hígado, confiriéndole su función inmune celular como órgano linfoide primario. Alcanza su tamaño máximo en la pubertad para involucionar en forma de restos adiposos en el adulto, aunque persiste como órgano linfoide activo²²². Las células de la CN estimulan la proliferación del epitelio tímico (derivado del endodermo faríngeo) y producen tejido mesenquimal que se diferencia en tejido conectivo y vasos sanguíneos tímicos. Además, la CN influye sobre el epitelio tímico para que éste estimule la proliferación de las células linfoides primitivas (“madre”) y se diferencien en timocitos maduros¹⁷⁶.

Histológicamente es un órgano linfático encapsulado, bilobular en el que cada lóbulo tiene su propia irrigación sanguínea, drenaje linfático e inervación. Está dividido en pseudolobulillos separados por tabiques de tejido conectivo. Cada lobulillo está formado por una zona periférica: la corteza, donde están los linfocitos, células epiteliales (denominadas células reticuloepiteliales) y macrófagos; y una zona central: la médula, formada fundamentalmente por células epiteliales y algunos linfocitos dispersos. En esta zona medular están los característicos “corpúsculos de Hasall”: constituidos por capas gruesas concéntricas de células epiteliales aplanadas, llenas de gránulos de queratohialina y queratina (Figura 18). Los linfocitos proliferan de forma continua en la corteza, algunos mueren y son destruidos por los macrófagos y el resto emigran hacia la médula desde donde entran en el torrente sanguíneo^{222, 223}.

El timo es el único órgano linfoide primario en los mamíferos y su función principal es la respuesta inmunitaria celular a través de la producción de linfocitos T “nativos”: aquellos que no han tenido contacto con sus antígenos. Cuando los linfocitos pasan al torrente circulatorio desde la médula tímica, migran a los órganos linfoides periféricos, y como linfocitos T (timodependientes) ejercen un papel primordial en la inmunidad celular y cooperan también con los linfocitos B en la respuesta inmunitaria humoral^{222, 224}.

Es el encargado de la diferenciación de las células linfocitarias primitivas (linfoblastos T) procedentes de la médula ósea. Durante su recorrido desde la corteza más superficial hasta la médula tímica estos linfocitos inmaduros incorporan receptores antigénicos específicos convirtiéndose en linfocitos T maduros capaces de reconocer los antígenos propios del individuo, que evitan en condiciones fisiológicas el desencadenamiento de reacciones autoinmunes²²⁵⁻²²⁷. Esta maduración linfocitaria se realiza en varios procesos sucesivos consistentes en la expresión de su receptor específico TCR, la *selección positiva* para el reconocimiento de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) propias del individuo, la expresión de correceptores CD4 y CD8; y finalmente un mecanismo de *selección negativa* mediante el cual se eliminan linfocitos inmaduros doblemente positivos (CD4+CD8+) que podrían reaccionar de forma dañina contra proteínas propias expresadas en el timo²²⁵.

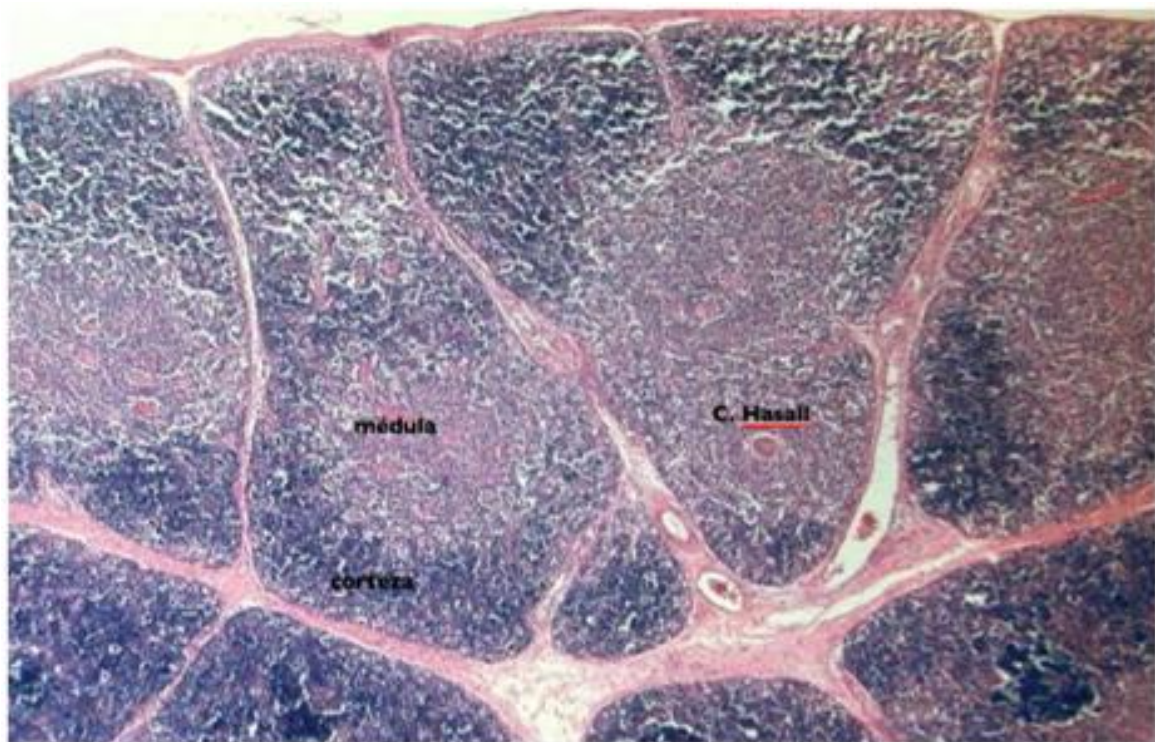


Figura 18.- Corte histológico de timo humano teñido con hematoxilina-eosina. En cada lobulillo tímico, separado por trabéculas de tejido conectivo, se diferencia la corteza: zona con elevada celularidad constituida por linfocitos en proliferación (que van madurando desde la región más periférica hacia la médula), células reticuloepiteliales y macrófagos; y la médula, formada fundamentalmente por células reticuloepiteliales y linfocitos maduros en menor cuantía, que pasan a la sangre para migrar hacia los órganos linfoides secundarios. En la médula se encuentran los característicos corpúsculos de Hassall (20-500 μm), formados por células reticuloepiteliales concéntricas con gránulos de queratina, que se tiñen intensamente con eosina.

Los Linfocitos T ^{228, 229}

Característicamente (a excepción de las células NK) y gracias a su receptor de membrana TCR, los linfocitos T sólo reconocen antígenos que vienen presentados por una molécula del CMH del mismo individuo con una “especificidad dual”: es decir, reconoce tanto al antígeno como a regiones de la molécula CMH que lo presenta. Puesto que las moléculas CMH sólo pueden presentar péptidos, los linfocitos T sólo reaccionan ante antígenos de origen proteico.

Los linfocitos T se clasifican en distintos tipos en función de los marcadores linfocitarios o “antígenos de diferenciación leucocitaria” (CD: *cluster differentiation*), que son proteínas de superficie de los leucocitos. Surgieron para la clasificación e identificación de estas células y para poder seguir una nomenclatura sistemática de las mismas. Estos CD se han clasificado según un criterio funcional en el proceso de interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T tal y como se describe a continuación (Tabla III).

- Linfocitos T CD8 (citotóxicos): son las células “efectoras” de la inmunidad celular mediante la interacción con antígenos unidos a CMH-I. Reconocen a las células infectadas por el patógeno y las destruyen mediante la secreción de sustancias citotóxicas: como granzima y perforina.

- Linfocitos T CD4+ (cooperadores): inician la cascada de la respuesta inmune coordinada cuando interaccionan con péptidos presentados por moléculas CMH-II. No son capaces de producir efectos citotóxicos o fagocitarios; sino que activan y dirigen a otras células inmunitarias en función de los estímulos que reciben al interaccionar con el antígeno extraño. Son esenciales en la activación de la formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B, en la activación y crecimiento de los linfocitos T citotóxicos y en el estímulo de la actividad bactericida de fagocitos como los macrófagos. Así, se diferencian funcionalmente distintos subtipos de linfocitos T CD4+:

.-Th1: segregan Interferón γ y migran a los tejidos infectados colaborando en la activación de los macrófagos.

.-Th2: Intervienen en las reacciones alérgicas y en las infecciones por parásitos, mediante la liberación de IL-4 (que estimula la secreción de IgE para la activación de los mastocitos) e IL-5 que activa a los eosinófilos.

.-Th17: median reacciones alérgicas mediante la liberación de IL-17, e intervienen en enfermedades de naturaleza inmune como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal.

- Linfocitos T memoria (CD4/CD8 Ro): se generan tras la activación de los linfocitos T después de la exposición a un antígeno extraño. Tienen una vida larga, circulando durante meses o años funcionalmente inactivos, preparados para responder a nuevas exposiciones del mismo patógeno.

- Linfocitos T reguladores (supresores): son los encargados de finalizar la respuesta inmune.

- Células NK (“natural killers). Procedentes del mismo precursor hematopoyético, que los linfocitos T, se diferencian de ellos por no expresar el receptor TCR y reconocer antígenos no expresados por moléculas del CMH, ejerciendo por lo tanto una función inmunitaria inespecífica de destrucción celular mediante la liberación de Interferón y otras citoquinas. Destruyen células infectadas o tumorales mediante procesos de lisis celular y apoptosis. También participan en reacciones inmunitarias de tipo humoral al interaccionar con distintos anticuerpos mediante receptores específicos para la región Fc de las inmunoglobulinas G. No expresan el marcador fenotípico característico de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3) y sí otros como CD56, CD2, CD16 ó LFA-1. Se localizan fundamentalmente en sangre y en el bazo, estando prácticamente ausentes en el timo.

MARCADOR CELULAR	FUNCIÓN	
CD3*	Anclaje correcto de TCR Transducción señales celulares	Marcador de linfocito T
CD4*	Co-receptor CMH-II	
CD8*	Co-receptor CMH-I	
CD16*	Reconocimiento Fc-Ig	
CD35	Receptor complemento	
CD40	Molécula de señalización	En CPA y LT
CD25	Receptor IL-2	
CD45	Marcador diferenciación celular	Marcador panleucocitario
CD45Ra	LT vírgen	
CD45Ro	LT memoria	
CD2	Adhesión celular	
CD28	Activación LT	

Tabla III.- Resumen de las principales subpoblaciones de Linfocitos T en función de los distintos marcadores celulares ("cluster differentiation": CD). Con asterístico (*) se muestran las células que participan en el reconocimiento específico del antígeno. La molécula TCR, no incluida en la tabla por no incluirse en la nomenclatura CD, también es un marcador celular de los linfocitos T. **LT**: linfocito T. **CPA**: célula presentadora de antígeno.

Las células parafoliculares o células C (CC):

Al proceder de los cuerpos ultimobranquiales, dependen de los mecanismos reguladores organogénéticos que ejerce la CN en el desarrollo de los órganos derivados del aparato faríngeo²³⁰. Se identificaron por primera vez en el tiroides del perro por Baber en 1876 y han recibido múltiples denominaciones a lo largo de los años debido a su localización y propiedades bioquímicas²³¹. Las primeras investigaciones sobre las CC se llevaron a cabo en la especie canina y se describían anexas a los folículos tiroideos por lo que se llamaron de forma genérica células parafoliculares²³². La confirmación posterior de que pudieran hallarse tanto a nivel folicular como entre los folículos, y de que fueran las responsables de la secreción de calcitonina (CT), llevó a que se denominaran de forma más correcta como células C^{231, 233-236}. Fue también en estos años 60 cuando se las relacionó con el origen del carcinoma medular de tiroides²³⁷.

Debido a sus características citoquímicas se incluyen dentro del sistema APUD (acrónimo del inglés *Amine and Precursor Uptake and Decarboxylation*) junto a otras células de origen neurocristal productoras de hormonas como las células cromafines de la médula adrenal, del intestino o las células corticotropas o melanotropas de la hipófisis^{223, 233, 238, 239}.

Se encuentran dentro del parénquima tiroideo, pero son independientes de las células foliculares productoras de hormona tiroidea, constituyendo menos del 0,1% del contenido celular tiroideo. Su relación aproximada con la células foliculares es de 1:10 y tienen una localización predominantemente parafolicular. Su función es la del almacenamiento y secreción de calcitonina (CT), hormona hipocalcemiante compuesta por 32 aminoácidos, que participa en la homeostasis del calcio^{240, 241}.

Las células C, además, segregan otras sustancias como somatostatina, sustancia P, péptido liberador de gastrina, serotonina, cromogranina, enolasa neuroespecífica y L-dopa carboxilasa^{242,244}.

Histológicamente, las CC se pueden diferenciar del resto de las células tiroideas mediante tinción con hematoxilina y eosina, presentando una forma poligonal con un gran núcleo y un citoplasma pálido con granulaciones en su interior que representan el acúmulo de CT^{236, 240, 245}. Sin embargo, el hecho de que en el humano estas células sean escasas y se distribuyan individualmente o en pequeños grupos, hace necesaria la utilización de otras técnicas más específicas²⁴⁶. Así, para su identificación se han utilizado tradicionalmente tinciones de plata capaces de detectar los gránulos secretorios del citoplasma que por su propiedad argirófila reducen las sales de plata de todas las células APUD. Estas tinciones se han sustituido actualmente por tinciones inmunohistoquímicas, que tiñen de forma específica el citoplasma de las células de C por su alto contenido en CT^{247, 248}.

El número y distribución de las CC varía entre distintos animales vertebrados y según la edad dentro de una misma especie^{159, 230}. Por ejemplo, los roedores poseen mayor número de estas células en relación al peso corporal total y a la masa tiroidea que los humanos, y esta cantidad relativa se incrementa con la edad²⁴⁹⁻²⁵¹. En cuanto a su distribución, en la mayoría de las especies las células C tienden a concentrarse en la región central de ambos lóbulos tiroideos²⁵², siendo mayoritarias en el área dorsolateral y tercio medio del tiroides^{246, 248, 253}.

La escasez de CC en la especie humana, junto a su difícil demostración con las técnicas habituales de detección hizo que se describieran más tardíamente que en otros mamíferos²⁴⁶. En el humano adulto se sitúan más frecuentemente entre los folículos, mientras que la presencia intrafolicular es mayor en los neonatos²⁵⁴, periodo en el que también se ha observado mayor cantidad de CC probablemente relativa por el menor tamaño tiroideo en este grupo de edad²⁵⁵. En este mismo contexto, es también significativo el hallazgo de altos niveles de CT en sangre de cordón de recién nacidos con respecto a los correspondientes niveles en sangre materna, lo que puede implicar a esta hormona en la regulación de la osificación fetal^{246, 250, 256}.

La *Calcitonina* se genera por un proceso de proteólisis en el que pasa de una forma inmadura compuesta por 116 aminoácidos, a una forma activa final que tan solo tiene 32. Existen distintos métodos basados en inmunoanálisis para la medición de la CT en sangre, por lo que los valores de referencia varían en cada caso. Los mejores test para su detección son los que utilizan la quimioluminiscencia, que usan doble anticuerpo y sólo miden la hormona madura. Tienen además una elevada sensibilidad pues detectan niveles muy bajos de CT en sangre, por lo que son muy útiles en el seguimiento del carcinoma medular de tiroides.

Las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) más tradicionales y ampliamente utilizadas, miden calcitonina total y otras proteínas de estructura bioquímica similar, siendo menos específicas y menos sensibles, por lo que suelen ofrecer niveles mayores de la hormona en sangre^{257, 258}. Atendiendo al desarrollo cronológico de estos métodos bioquímicos de detección hormonal²⁵⁹, estas técnicas RIA se clasifican en los tres tipos:

- 1) RIA de primera generación, que utiliza anticuerpos policlonales y detectan CT y otras proteínas. El límite alto de la normalidad con esta técnica está en torno a 50 pg/ml^{257, 258}.
- 2) RIA de segunda generación o inmunorradiometría (IRMA). Es más sensible y mide únicamente la molécula de CT intacta. Detecta niveles de 10 pg/ml²⁶⁰.
- 3) RIA de tercera generación o inmunoquimioluminiscencia (ICMA). Los niveles de normalidad basales son inferiores a 5 pg/ml en mujeres y menores a 8,5 pg/ml en varones.

Tanto las técnicas de IRMA como ICMA utilizan dos anticuerpos para la detección de la forma monomérica la molécula de CT, y se consideran sensibles y reproducibles en el ámbito clínico y de la investigación^{260, 261}.

4.6.4. LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO²⁶²⁻²⁶⁴

Las estructuras derivadas de la 3ª, 4ª y 5ª bolsas faríngeas: las glándulas Paratiroides y el Cuerpo Últimobranquial, tienen como función principal la participación en la regulación del metabolismo fosfocálcico a través de la secreción de sus hormonas: paratohormona (PTH) y calcitonina respectivamente. Éstas, junto a la Vitamina D son las denominadas “hormonas calciotropas”, que influyen también en la regulación de la masa ósea (MO) en la medida en la que ésta última depende del equilibrio fosfocálcico.

Los componentes del metabolismo fosfocálcico son el Calcio, el Fósforo y el Magnesio, nutrientes esenciales que se concentran mayoritariamente en el hueso en un 99%, 85% y 65% respectivamente. Estos iones participan en múltiples funciones biológicas por lo que el mantenimiento de sus mínimos niveles séricos mediante el aporte externo en la dieta y un adecuado metabolismo fosfocálcico es de vital importancia²⁶².

La concentración plasmática total de calcio oscila entre 8,4 y 11,3 mg/dl, y la de fósforo entre 2,5 y 7,4 mg/dl. Estos niveles varían en función de la edad, por lo que se establecen distintos rangos de normalidad en función de ésta, tal y como se muestra en la Tabla IV.

En el plasma, el calcio se encuentra como 1) calcio ionizado o libre (Ca^{2+}), la fracción biológicamente activa, 2) formando complejos con iones orgánicos como el citrato y, 3) unido a proteínas, fundamentalmente a la albúmina (Tabla IV). Tiene una absorción intestinal escasa. El escaso calcio urinario, se reabsorbe o elimina en los túbulos renales en función de la actividad de la PTH, su principal regulador a este nivel, dependiente de los niveles de calcio sérico.

Por el contrario, la mayoría del fósforo se encuentra libre o en forma de fosfatos (HPO_4^{2-} ó H_2PO_4^+) en función del pH plasmático; y sólo un 10% se une a proteínas. Se absorbe fácilmente en el intestino y se elimina mayoritariamente con la orina.

	Calcio sérico (mg/dl)	Calcio iónico (mM/l)	Fósforo (mg/dl)
0-3 meses	8,8-11,3	1,22-1,40	4,8-7,4
1-5 años	9,4-10,8	1,22-1,32	4,5-6,5
6-12 años	9,4-10,3	1,15-1,32	3,6-5,8
>12 años (*)	8,8-10,8	1,12-1,32	2,5-4,9

Tabla IV.- Niveles normales de calcio y fósforo séricos en los distintos grupos de edad, según las "Guías de Actuación de la National Kidney Foundation. Kidney Disease Outcome Quality Initiative" (NKF/KDOQI) 265. (*): A partir de los 12 años se consideran los valores de la edad adulta proporcionados por cada laboratorio

La *PTH* es una hormona hipercalcemiante que potencia la resorción ósea de calcio y fósforo, y la absorción intestinal de calcio. A nivel renal, favorece la reabsorción tubular renal de calcio y la eliminación de fosfatos, y estimula la síntesis renal de la forma activa de la vitamina D ($1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$) mediante la hidroxilación α . Su función se regula de forma muy sensible por los niveles de calcio sanguíneos, de tal forma que niveles bajos de calcio en sangre la estimulan y por el contrario, niveles elevados la inhiben. Es una proteína pequeña formada por 84 aminoácidos. Aunque se pueden detectar en suero productos de degradación de la PTH, la valoración que se utiliza en clínica es la medición de PTH completa o intacta: PTHi (Figura 19).

La *Calcitonina* es una hormona hipocalcemiante: disminuye la concentración plasmática de calcio. Interviene en la disminución de la calcemia mediante dos acciones contrarias a la PTH. Por una parte inhibe a los osteoclastos y por lo tanto, la resorción ósea, y por otra: disminuye la reabsorción renal de calcio. Su papel regulador del metabolismo fosfocálcico es menos importante que el de la PTH y Vitamina D, cuestionándose en ocasiones su funcionalidad en humanos. Los niveles de calcio en sangre influyen en la secreción de Calcitonina, de tal forma que incrementos superiores al 10% de la calcemia estimulan su síntesis y secreción por las células C tiroideas, en un efecto rápido pero menos energético y duradero que sobre la PTH, por lo que el mantenimiento de la calcemia a largo plazo se ejerce por ésta última.

La *Vitamina D* es una prohormona esteroidea que se encuentra en la sangre en dos formas químicas diferentes: la vitamina D2 (Ergocalciferol), de origen vegetal, y la vitamina D3 (Colecalciferol), sintetizada en la piel a partir de 7-dehidrocolesterol mediante la estimulación de la luz ultravioleta, u obtenida en la dieta alimenticia. Su síntesis no guarda por lo tanto relación con órganos derivados de los arcos faríngeos, pero se trata en este apartado por ejercer un papel primordial en el metabolismo fosfocálcico y mineral.

La vitamina D3 es el metabolito más abundante en el plasma pero es biológicamente inerte. Se transforma en su forma activa hormonal, el $1,25\text{-dehidrocoleciferol}$ ($1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$) o Calcitriol, en el riñón tras la hidroxilación 1α en la molécula de Colecalciferol estimulada por la PTH, como se ha descrito anteriormente.

La Vitamina D tiene una acción hipercalcemiante mediante la estimulación de la absorción intestinal de calcio y fósforo, y de la reabsorción de los iones de calcio y fosfato en los túbulos renales. Además favorece la mineralización ósea mediante el incremento de la aposición de calcio en el hueso. Junto a la PTH, tiene una función importante en la homeostasis cálcica y en la regulación del metabolismo fosfocálcico.

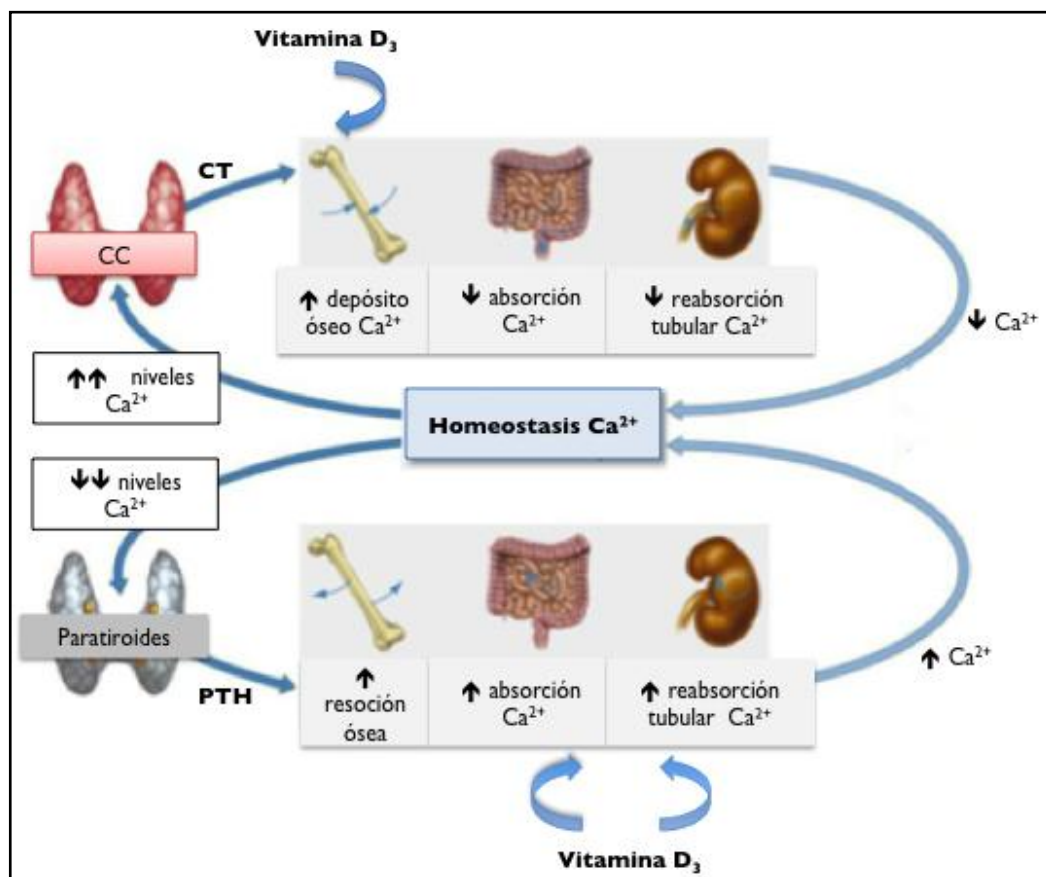


Figura 19. Funciones de Calcitonina (CT), Paratohormona (PTH) y Vitamina D en la homeostasis cálcica. Cuando los niveles sanguíneos de Ca^{2+} aumentan, se estimula la liberación de CT por las células parafoliculares tiroideas (CC), que tras actuar en sus órganos diana (hueso, intestino y riñón) produce una disminución de los mismos. Al contrario, cuando se produce una situación de hipocalcemia, se estimula la glándula paratiroides y se libera PTH, que a través de una acción hipercalcémica sobre los mismos órganos, restablece los niveles de calcio en plasma. La vitamina D ejerce también predominantemente una acción hipercalcémica equivalente a la PTH, pero a diferencia de ésta, estimula el depósito óseo de calcio y fósforo, favoreciendo la mineralización ósea

4.6.4.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL HUESO. REMODELACIÓN ÓSEA.

El tejido óseo, es una estructura metabólicamente activa y dinámica, sometida continuamente a procesos de neoformación y destrucción (*resorción*) ósea. Entre sus funciones están: 1) conferir soporte y resistencia a las cargas biomecánicas del cuerpo, 2) actuar como tampón del metabolismo mineral y regulador del metabolismo fosfocálcico y 3) funcionar como órgano hematopoyético. Está formado por células: *osteoblastos* y *osteoclastos*, y por una matriz extracelular de dos tipos: la matriz orgánica (osteóide) y la inorgánica o mineralizada que le confiere la resistencia y dureza al hueso.

Introducción

Los Osteoblastos tienen un origen mesenquimal, procedentes de unas células pluripotenciales (“unidades formadoras de colonias de fibroblastos”: UFC-F), que se diferencian en osteoblastos por la acción de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Los osteoblastos a su vez proliferan, estimulados también por factores locales de crecimiento (*Insulin Growth Factor: IGF*, el más importante) y hormonas (PTH, Vitamina D, esteroides gonadales, hormonas tiroideas, glucocorticoides y hormona de crecimiento: GH), maduran a osteocitos (sin capacidad de proliferación) y finalmente mueren por apoptosis programada^{266, 267}.

Como función principal, se encargan de la *neoformación* ósea a través de la síntesis de colágeno tipo I, proteoglicanos, osteocalcina y fosfatasa alcalina: principales proteínas constituyentes de la matriz extracelular orgánica.

Además, sintetizan factores locales de crecimiento que de forma autocrina-paracrina regulan sus propias funciones y las de la otra estirpe celular, los osteoclastos (Tabla Va), participando también en la resorción ósea mediante la síntesis de colagenasas. Esta doble implicación en la formación y resorción ósea convierte a los osteoblastos en las células clave del control del metabolismo óseo y de los procesos de neoformación y resorción ósea.

Los Osteoclastos son células gigantes multinucleadas de origen hematopoyético, derivadas de células pluripotenciales de la familia de los monocitos y macrófagos. Son los responsables de la *resorción* ósea, mediante una acción enzimática hidrolítica mediada por fosfatasas ácidas, colagenasas y metaloproteinasas. Estas enzimas actúan por el mecanismo de la *anhidrasa carbónica* que cataliza la formación de ácido carbónico en bicarbonato e iones H^+ , acidificando el medio extracelular lo que lleva a la desmineralización de la matriz extracelular²⁶⁸.

La acción de los osteoclastos se regula principalmente por la acción de la CT y PTH, además de influir otras hormonas como: estrógenos, hormonas tiroideas o glucocorticoides y otras sustancias locales (citoquinas) (Tabla Vb).

Cuando las concentraciones de calcio disminuyen en la sangre, las glándulas paratiroides secretan PTH que estimula a los osteoclastos y por lo tanto la resorción ósea. Cuando dichas concentraciones de Ca^{2+} aumentan, se estimula la secreción de CT por las glándulas parafoliculares tiroideas, inhibiéndose la resorción ósea.

La Matriz Extracelular Orgánica se compone de colágeno tipo I en un 90%, sustancia sobre la que se depositan los cristales de hidroxapatita, siendo el encargado de conferir elasticidad al hueso. En el hueso cortical (80% de la masa ósea), este colágeno se dispone en láminas formando cilindros concéntricos (sistema de Havers) y en el hueso esponjoso (20%), de mayor actividad metabólica, adquiere una disposición trabecular.

Además del colágeno, la matriz osteoide está formada por las siguientes proteínas que se citan a continuación²⁶⁴:

.-*Osteocalcina*: su síntesis en el osteoblasto está influenciada por los niveles de vitamina K y D. Interviene en la formación de hueso nuevo, por lo que sus niveles séricos son un indicador de la actividad osteoblástica.

.-*Osteonectina*: forma un complejo con la fosfatasa ácida y actúa en la unión de colágeno, calcio e hidroxapatita; además de participar en la adhesión celular junto a la osteopontina.

.- *Sialoglicoproteínas*: influyen en la tasa de formación y tamaño final de las fibras de colágeno.

.-*Proteoglicanos, Fosfatasa Alcalina, Fibronectina, Osteopontina, Metaloproteinasas*: ejercen una acción local en la remodelación ósea.

La Matriz Extracelular Inorgánica (mineralizada) se compone de cristales de hidroxapatita formados por calcio y fósforo que se depositan sobre el osteoide.

En condiciones normales existe un equilibrio en la cantidad y disposición de los dos tipos de matriz extracelular dotando al hueso sano de unas características adecuadas de elasticidad (colágeno-osteoide) y dureza (hidroxapatita-matriz inorgánica). Desequilibrios a este nivel, pueden ocasionar en la edad pediátrica patologías óseas opuestas, como la Osteoporosis o la Osteogénesis Imperfecta (OI). En la *Osteoporosis*, se produce un depósito excesivo de minerales con aumento de la rigidez y disminución de la resistencia ósea. Por el contrario, en la OI se altera la matriz osteoide con una disposición desorganizada del colágeno, disminución de la elasticidad y aumento de la fragilidad ósea.

Remodelación Ósea

El equilibrio entre la neoformación y resorción óseas que en condiciones fisiológicas permite que estos dos procesos se produzcan de forma ordenada y secuencial en tiempo y espacio mediante “ el acoplamiento” regulado por los osteoblastos, da lugar al “remodelado óseo” (resorción y neoformación sucesivas) y a la regulación de la masa ósea, permitiendo la renovación de tejido óseo.

Aunque el remodelado óseo ocurre durante toda la vida, su actividad es más intensa durante las fases del crecimiento: en la infancia y adolescencia. Así, la masa ósea, que depende de factores genéticos y ambientales, aumenta durante estas fases de desarrollo, estabilizándose a los 20 años²⁶⁹. La máxima masa ósea (pico de masa ósea) se alcanza en la pubertad y se mantiene estable hasta los 30 años de edad, disminuyendo progresivamente hasta este momento^{270, 271}.

En el estudio de la remodelación ósea es necesario definir los conceptos de *Modelado*, *Recambio* y *Balance* óseos, por formar parte de este proceso:

.- *Modelado óseo*: crecimiento del hueso en longitud y volumen durante la época de crecimiento del niño que finaliza con el cierre del cartílago de crecimiento de las placas epifisarias en la edad adulta.

.- *Recambio óseo*: volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo durante el proceso de remodelación ósea.

.- *Balance óseo*: diferencia entre la cantidad de hueso destruido (resorción) y la cantidad de hueso formado (neoformación) en una unidad de remodelación. Este balance está regulado por la acción de las hormonas calciotropas y por factores locales. Cuando este balance es cero, no se producen variaciones en la cantidad de masa ósea. En las épocas de crecimiento el balance es positivo y a partir de los 40 años se instaura un equilibrio negativo con pérdida de 0,5-1% de la masa ósea al año, siendo constante en los varones y con períodos de agudización influenciados por factores hormonales en las mujeres (menopausia)²⁷².

En la edad pediátrica diversas situaciones patológicas (déficits nutricionales, trastornos malabsortivos, alteraciones hormonales o tratamientos farmacológicos) pueden derivar en un incremento de la resorción ósea con balances óseos negativos, pérdida de masa ósea y Osteoporosis como resultado final^{263, 273, 274}.

Esta regulación de la remodelación ósea y por lo tanto de la cantidad de masa ósea depende, como se ha comentado anteriormente, de una correcta regulación hormonal del metabolismo fosfocálcico por las hormonas calciotropas, así como por los esteroides gonadales (disminuyen el recambio óseo), hormonas tiroideas (lo estimulan), hormonas suprarrenales, insulina o la hormona de crecimiento (GH). Pero además en este equilibrio, participan también sustancias locales (citoquinas) que influyen sobre las acciones de osteoblastos y osteoclastos, en ocasiones, también como en el caso de las hormonas, a ambos niveles balanceando la remodelación ósea hacia la formación o destrucción de hueso^{267, 275-277} (Tabla Vb).

Por último, factores físicos relacionados con la carga mecánica que soporta el hueso también se han demostrado reguladores de la remodelación ósea; situaciones que conllevan un aumento de la carga mecánica favorecen la formación ósea (actividad física, crecimiento) y al contrario, situaciones de inmovilización prolongada la inhiben²⁶⁸.

El estado de remodelación ósea y por lo tanto del balance óseo, se puede valorar de forma indirecta mediante la detección y medición de determinadas sustancias en plasma u orina ("marcadores"), que participan en los fenómenos de neoformación y resorción y en las que se producen variaciones de sus niveles séricos en función del predominio de uno sobre otro proceso^{278, 279}. Con el objetivo de conocer sus valores normales en niños sanos, se han realizado en nuestro país estudios sobre poblaciones sanas en distintos grupos de edad (< 4 años; 4-10 años y 10-14 años) en función de los patrones habituales de alimentación en esta época de la vida, de la evolución de la densitometría ósea a lo largo de la infancia y del desarrollo puberal, en estrecha relación con la mineralización ósea²⁸⁰.

	Osteoblasto	Osteoclasto	Balance
PTH	+	+	Negativo (LC) Positivo (LP)
CT	-	+	Positivo débil
Vitamina D	+	-	Positivo
Estrógenos Andrógenos	-	+	Positivo
GH	-	+	Positivo
H. Tiroideas	+	+	Negativo
Corticoides	+	-	Negativo
Insulina	-	+	Positivo
Noresteroides	-	+	Positivo

Tabla Va.-Regulación hormonal de la remodelación ósea. Se resumen las acciones de cada hormona sobre osteoclastos y osteoblastos, representando su activación con signo (+) y su inhibición con signo (-). Se puede observar la doble acción de algunas hormonas sobre la resorción y neoformación ósea, resultando en un balance final positivo o negativo en función del predominio sobre una de estas dos funciones. También el tipo de liberación hormonal :continua (LC) o pulsátil (LP), produce efectos contrarios sobre el balance final en la remodelación ósea.

	Acción	Resorción	Neoformación
IL-1	Estimulación de osteoclastos	+	-
IL-3	Estimulación síntesis de osteoclastos	+	-
IL-4 IL-18	Inhibición de osteoclastos	-	
IL-6 IL-11	1.- Estimulación síntesis osteoclastos 2.- Estimulación de diferenciación de UFC-F a osteoblastos	+	+
TNF-α	\uparrow síntesis IL-1/IL-6	+	-
IGF1/TGBβ	Estimulación de osteoblastos		+
M-CSF/GM-CSF	Estimulación de osteoclastos	+	

Tabla Vb.- Efecto local de las citoquinas sobre los procesos de resorción y neoformación durante la remodelación ósea. **IL.** Interleuquina.; **TNF α** : factor de necrosis tumoral alfa. **FLI**: factor leucémico inhibidor. **INF γ** : interferon gamma. **M-CSF**: factor estimulante de colonias de macrófagos. **GM-CSF**: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

El conocimiento de estos valores de referencia (Tabla VI) resulta una herramienta muy útil en la práctica clínica ya que permite valorar el estado de la mineralización ósea de la población infantil en situación de riesgo de padecer osteopenia /osteoporosis, siendo su monitorización, una medida preventiva muy útil en estos casos vulnerables²⁷⁹.

Marcadores de formación ósea:

.-*Fosfatasa Alcalina (FA)*: enzima secretada por los osteoblastos, pero no es específica (también en hepatocitos, células intestinales y renales). En los niños el 80% procede del hueso. Es posible la detección de la FA ósea específica en suero.

.-*Osteocalcina*: proteína no colágena presente en el hueso, dentina y otros tejidos mineralizados. Se sintetiza por los osteoblastos y condrocitos de la matriz ósea del hueso. Ritmo circadiano en la producción y liberación: cuantificaciones séricas matutinas.

.-*PICP* (Propéptido Carboxiterminal del Procolágeno I): precursor del colágeno tipo I, sintetizado por el osteoblasto en la matriz orgánica ósea. Se encuentra libre en el líquido intersticial y en la sangre. Medición sérica.

.-*PINP* (Propéptido Aminoterminal del Procolágeno tipo I): precursor del procolágeno tipo I. Medición sérica.

Marcadores de resorción ósea:

.-*ICTP* (Telopéptido Carboxiterminal del Colágeno tipo I): producto de degradación del colágeno tipo I. Medición en suero.

.-*Ntx* (N- Telopéptido Del Colágeno Tipo I): producto de degradación del colágeno tipo I. Medición en suero y orina.

.-*Hidroxiprolina*: aminoácido no esencial, componente de las proteínas del colágeno (constituyen un 10% de las moléculas de colágeno) del hueso y del tejido conjuntivo. Tras la degradación del colágeno durante la resorción ósea, se libera con la orina. Su excreción urinaria está influida por la dieta por lo que debe hacerse una dieta exenta de gelatinas las 48h previas a su medición urinaria.

.- *Piridolina*: aminoácido cíclico que forma puentes de unión molecular para la estabilización de las fibras de colágeno de la matriz extracelular ósea. Se libera en forma libre (40%) o unida a proteínas (60%) durante la resorción ósea y es eliminada por vía urinaria, con la ventaja con respecto a la hidroxiprolina de que no depende de factores dietéticos.

.- Calcio urinario (calciuria): aumenta cuando se destruye la matriz ósea

Parámetros de aposición ósea

	0-4 años		4-10 años		10-14 años	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Osteocalcina (ng/ml)	17,424	6,118	15.128	7,206	17,696	9,943
Propéptido C terminal (ng/ml)	324,906	193,788	195,038	120,664	242,893	141,688

Parámetros de resorción ósea

	0-4 años		4-10 años		10-14 años	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Hidroxiprolina (mg/l)	150,474	107,097	182,027	136,972	201,847	94,342
Hidroxiprolina/Cr (mg/mg)	0,267	0,092	0,166	0,057	0,150	0,059
Piridolina (nmol/l)	910,358	767,098	959,419	697,898	1058,23	382,773
Piridolina/Cr (nmol/nmol)	183,108	63,564	99,457	32,419	89,087	31,881

TablaVI. - Marcadores de remodelado óseo en una población de niños sanos (Manjón Llorente, 2004 279)

Como puede observarse, tanto los marcadores de aposición como los de resorción ósea se encuentran elevados durante los 4 primeros años de la vida, lo que evidencia un importante recambio óseo en esta etapa. Los parámetros de aposición se mantienen prácticamente estables durante la infancia (el propéptido C terminal disminuye ligeramente entre los 4 y 10 años) y comienzan un incremento constante y progresivo desde los 10 años hasta la pubertad, lo que traduce un predominio de la neoformación y mineralización ósea en esta etapa de crecimiento.

Por el contrario, los niveles de hidroxiprolina y piridolinas urinarias, descienden a partir de los 4 años de forma constante, mostrando una correlación negativa con la edad e indicando una disminución de los fenómenos de resorción ósea durante el crecimiento.

Se ha demostrado además, que los marcadores de resorción ósea muestran una correlación negativa con el peso y por lo tanto con el IMC, sin haberse podido demostrar una correlación positiva entre éste y los parámetros de aposición ósea.

4.6.4.2. OSTEOPOROSIS EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA.

La osteoporosis es una enfermedad ósea sistémica caracterizada por la disminución de la cantidad de masa ósea, alteración de la microarquitectura del hueso y aumento de su fragilidad y, por lo tanto, del riesgo de fracturas²⁶².

Para alcanzar un adecuado pico de masa ósea en la edad adulta es fundamental obtener una masa ósea adecuada durante la fase de crecimiento en la infancia. Alteraciones en cualquiera de los factores que regulan la masa ósea (genéticos, ambientales nutricionales, hormonales o físicos) durante la época de crecimiento, pueden interferir en la consecución de este pico de masa ósea, dando lugar a situaciones de osteopenia u osteoporosis en la infancia, adolescencia o, más a largo plazo, en la edad adulta^{272, 281, 282}.

Población pediátrica de riesgo para desarrollar osteoporosis:

- .- Alteraciones Genéticas: cromosomopatías (Síndromes de Turner, Klinefelter y Down), enfermedades del colágeno (Osteogénesis Imperfecta, trastorno en la formación del colágeno tipo I y causa más frecuente de osteoporosis hereditaria); o enfermedades metabólicas.
- .- Problemas nutricionales: enfermedades malabsortivas con disminución en la absorción de calcio, fósforo o vitamina D; enfermedades crónicas; situaciones de malnutrición crónica (anorexia nerviosa, dietas restrictivas).
- .-Trastornos hormonales: déficit de GH, hipogonadismos, diabetes, hipo/hipertiroidismo, hipo/hiperparatiroidismo.
- .-Fármacos: glucocorticoides, anticomiciales, quimioterápicos, etc..
- .- Actividad física inadecuada: tanto el ejercicio físico intenso, como el sedentarismo o las imovilizaciones prolongadas.

Prevención y Tratamiento:

El mejor tratamiento de la osteoporosis es su prevención durante la infancia y la adolescencia mediante una adecuada ingesta de calcio, vitamina D, y la realización de ejercicio físico. El aporte diario de calcio recomendado en la infancia varía en función de la edad (Tabla VII). Las necesidades diarias de vitamina D (100 UI en niños sanos), se aportan en gran medida con la exposición solar, pero es aconsejable la administración de suplementos de vitamina D durante la lactancia (200 UI/día), ya que su único alimento, la leche, es rica en calcio, pero pobre en vitamina D. Aportes mayores son necesarios en prematuros o en niños con patologías o factores de riesgo para el desarrollo de osteopenia u osteoporosis.

Para el tratamiento de la osteoporosis, se dispone de distintos fármacos como la Calcitonina, la PTH (a dosis bajas e intermitentes tienen un efecto anabolizante que incrementa la DMO) o el Flúor, ampliamente utilizados en adultos, pero sin indicación aún en la población pediátrica por la potencias aparición de efectos secundarios tras tratamientos crónicos, demostrados en animales de experimentación^{283, 284}.

La Hormona de Crecimiento (estimulante de los osteoblastos) y más aún, los Bifosfonatos (inhibidores de la resorción ósea) son los dos tratamientos principales en el tratamiento de la osteoporosis infantil. El tratamiento con Hormona de Crecimiento está indicada en pacientes con osteoporosis y déficit de GH, en el Síndrome de Turner, en situaciones de insuficiencia renal crónica o en la Osteogénesis Imperfecta.

Los Bifosfonatos son análogos sintéticos del pirofosfato inorgánico (inhibidor de la formación y agregación de los cristales de fosfato cálcico), se fijan a los cristales de hidroxapatita e inhiben la resorción ósea inhibiendo a su vez a los osteoclastos. Están indicados en el tratamiento de la osteoporosis y de la Osteogénesis Imperfecta.

Edad	Calcio (mg/día)
0-6 meses	210 mg/día
7-12 meses	270 mg/ día
1-3 años	500 mg/día
4-8 años	800 mg/día
9 años-adolescencia	1200-1500 mg/día

Tabla VII. Necesidades de calcio en la población pediátrica.

Diagnóstico De Osteoporosis En La Población Pediátrica:

El diagnóstico de Osteoporosis se realiza mediante la cuantificación de la masa ósea a través de técnicas de densitometría ósea; con el cálculo absoluto del Contenido Mineral Óseo (gramos de hidroxapatita); y con medidas relativas a la superficie o volumen explorados: Densidad Mineral Ósea (DMO) y Densidad Mineral Ósea Volumétrica (DMOV), respectivamente^{262, 285}.

La *Densidad Mineral Ósea (DMO)* es el contenido mineral en el área proyectada (g/cm^2) y es la medida más utilizada en la clínica. Con la relativización del contenido mineral óseo respecto al área estudiada, se disminuye en gran medida la influencia de las diferentes alturas sobre el CMO.

La *Densidad Mineral Ósea Volumétrica (DMOV)*: es el contenido mineral óseo respecto al volumen de la región estudiada (g/cm^3). Como las estructuras óseas medidas son tridimensionales, el CMO depende exactamente del volumen de la zona explorada y éste a su vez de su altura y por lo tanto de la talla del individuo. Por eso, los valores densitométricos hay que compararlos con sujetos de edades y tallas similares en la población pediátrica. La DMOV no suele utilizarse en la práctica por la mayor dificultad para el cálculo del volumen, por lo que las medidas de CMO se relacionan con la superficie vertebral, más precisa; dándose los datos de masa ósea en DMO (g/cm^2) habitualmente. Además se ha demostrado en múltiples estudios una buena correlación entre los resultados de DMO_v y DMO ^{286, 287}.

La técnica de elección para el diagnóstico de Osteoporosis en la población infantil es la Densitometría Ósea de doble energía (DEXA). Es una técnica de imagen no invasiva, con un alto índice de reproductibilidad (99%), corto tiempo de exposición (3-5 minutos), mínima dosis de radiación (0,002% del límite anual establecido para la población) y elevada sensibilidad para valorar tanto el hueso cortical como el trabecular. Su principio físico se basa en la capacidad de atenuación de una fuente de energía al atravesar el hueso, que es proporcional al contenido mineral de la matriz extracelular. Sobre esta base física y con la combinación del análisis cuantitativo, la estadística y la imagen, esta técnica permite la obtención de datos de masa ósea.

La densitometría cuantifica la densidad de los depósitos minerales óseos que condiciona sus propiedades mecánicas. De esta forma, valora de forma indirecta la resistencia del esqueleto óseo y el riesgo de fracturas, habiéndose convertido en las dos últimas décadas en la herramienta fundamental no sólo para el diagnóstico de osteoporosis sino también para su seguimiento evolutivo y la monitorización de su tratamiento.

En función de la fuente energética utilizada y de la superficie corporal medida, se han ido desarrollando distintas técnicas de Densitometría Ósea (ver esquema), basadas todas ellas en las primeras ideadas por Cameron y Soren en 1963 en las que se utilizaba una única fuente emisora de rayos gamma ("monoenergéticas"), que tenían como inconveniente la distorsión de la medición mineral ósea cuando la fuente energética interaccionaba con tejidos blandos.

Con el paso del tiempo y los avances tecnológicos, estas técnicas monoenergéticas se han sustituido por sistemas de doble energía que permiten la corrección de la variación del grosor de los tejidos blandos; y las fuentes emisoras isotópicas por generadores de rayos X, lo que ha dado lugar a la "Absorciometría Radiológica de Doble Energía" (DEXA), técnica utilizada en la actualidad.

En función del área explorada, la densitometría puede ser Corporal Total (también denominada *Central* o *Axial*) o localizada en algún área específica (*Periférica*), habitualmente en la columna lumbar o extremidades. Las dos zonas de mayor rendimiento diagnóstico son el tercio superior del fémur (cuello, triángulo de Ward y trocánter) y la columna lumbar (la más utilizada en la población pediátrica) por contener mayor proporción de hueso trabecular, con mayor grado de recambio óseo y más sensible a los cambios metabólicos que el hueso cortical.

Pruebas de imagen para el estudio de masa ósea

Contenido Mineral Óseo Corporal Total

Absorciometría Radiológica de Doble Energía (DEXA)

2.- Contenido Mineral en Regiones Específicas

Fotodensitometría Radiológica

Absorciometría Radiológica de Doble Energía (DEXA)

Axial (Columna Lumbar)

Periférica (Fémur)

Ultrasonidos

Tomografía Computarizada

Columna

Antebrazo

I.-

La región lumbar preferida y más empleada por su mayor reproductibilidad es la que corresponde a las cuatro primeras vértebras lumbares (L_1 - L_4) en la proyección posteroanterior. Si se produce algún artefacto sobre alguna de ellas, se debe descartar del estudio, considerándose válida la densitometría de columna lumbar cuando se pueden estudiar al menos dos vértebras²⁸⁸.

Se han elaborado distintos estudios sobre la evolución de la densidad de masa ósea mediante densitometría ósea lumbar (DEXA) en la infancia y adolescencia, tanto en poblaciones sanas como patológicas, o con riesgo de osteoporosis, observándose la misma tendencia que con los marcadores de remodelado óseo con adquisición ósea máxima al final de la pubertad²⁸⁹⁻²⁹³. Caben destacar los publicados por Carrascosa y colaboradores durante el período 1998-2000, en los que se establece el patrón de adquisición de masa ósea de una población sana de edades entre 3 meses y 20 años^{272, 294-296}. Éstos han permitido la obtención de valores de referencia para la interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas densitométricas.

De este modo, en la práctica clínica, los resultados de las densitometrías realizadas se ofrecen según las puntuaciones *T-score* y *Z-score*. La puntuación *T-score* (índice T-score) utilizada en adultos, se corresponde con la comparación del valor obtenido respecto al valor medio máximo teórico alcanzado en el momento de mayor madurez ósea (pico de masa ósea). La desviación estándar es la medida de dispersión utilizada para cuantificar la variabilidad (variación) con respecto al valor teórico (de la población de referencia). Así, el índice T es la diferencia en número de DE con respecto al valor del pico de masa ósea.

La puntuación *Z-score* (índice Z), es la medida utilizada durante la infancia y la pubertad. En la medida en que la DMO depende de la edad, talla y estadio puberal, la puntuación *Z-score* supone la comparación con respecto al valor medio de la población de similar edad y sexo que el paciente explorado. El índice *Z-score* es la diferencia en DE con respecto al valor de masa ósea de referencia para esa edad y sexo según patrones establecidos para niños sanos.

En función del grado de afectación ósea y riesgo de fractura (aumento del riesgo relativo de fractura de 1,5 a 2,5 veces por cada disminución de 1 DE en la DMO con respecto a la población de referencia), la OMS definió en el año 1994 cuatro categorías de afectación ósea para la población adulta, definidas según el índice T-score:

Exploración Normal: T-score: superior a -1 DE.
Osteopenia: puntuación T entre -1 DE y -2,5 DE
Osteoporosis: T inferior a -2,5 DE.

Aunque no se han establecido específicamente criterios de osteopenia y osteoporosis en los niños, se utilizan los mismos criterios que en adultos para el *Z-score*.

4.7. EL CORAZÓN Y LOS GRANDES VASOS. LA CN CARDÍACA.

El aparato cardiovascular es el primer sistema importante en comenzar a funcionar en el embrión, que debido a su rápido crecimiento no puede satisfacer sus necesidades nutritivas y de oxígeno sólo por difusión. Necesita pues de un sistema que le aporte oxígeno y nutrientes de una forma más eficaz desde la sangre materna y que le permita también eliminar mejor los productos de desecho. A continuación se describen los principales hitos del desarrollo cardiovascular en base a la información contenida en los textos de Larsen y Moore^{32, 215} al respecto.

4.7.1. EL CORAZÓN:

El corazón se forma en la tercera SDG a partir de varias estructuras:

- a) mesodermo esplácnico: forma el primordio del corazón.
- b) mesodermo paraxial y lateral: en la región cercana a las placodas óticas.
- c) células de la CN: La CN Cardíaca.

El primer indicio del corazón se forma a partir de unos cordones angioblásticos en el mesodermo cardiogénico (mesodermo esplacnopleural) del extremo cefálico del disco embrionario en la 3ª SDG. Estos cordones se canalizan y transforman en dos tubos cardíacos endocárdicos que, coincidiendo con el plegamiento embrionario, se fusionan en dirección craneocaudal para originar el corazón tubular primitivo en respuesta a las señales del endodermo subyacente. Este corazón primitivo ya empieza a latir en la cuarta SDG.

Hacia las 21 semanas, este tubo se divide en dos cavidades: el *surco bulboventricular* y el *surco auriculoventricular* (Figura 20). El miocardio se forma por el revestimiento del mesodermo esplacnopleural y el epicardio por células mesoteliales que migran desde la superficie externa del seno venoso y revisten el miocardio. Aproximadamente en la 23ª SDG se produce el plegamiento cardíaco asociado al plegamiento lateral y cefálico del embrión. De esta forma, la cavidad pericárdica y el corazón se sitúan ventralmente al intestino anterior y caudal con respecto a la membrana bucofaríngea. A medida que el corazón se alarga y se va plegando adquiere forma de “S” y desarrolla una serie de dilataciones y constricciones:

- El tronco arterioso (conotrunko?): se continúa a nivel craneal con el saco aórtico, del que surgen los arcos aórticos.
- El bulbo cardíaco.
- Ventrículo.
- Aurícula.
- Seno venoso: recibe las venas vitelinas (desde el saco vitelino), las venas umbilicales (desde el corion) y las v.cardinales (desde el embrión).

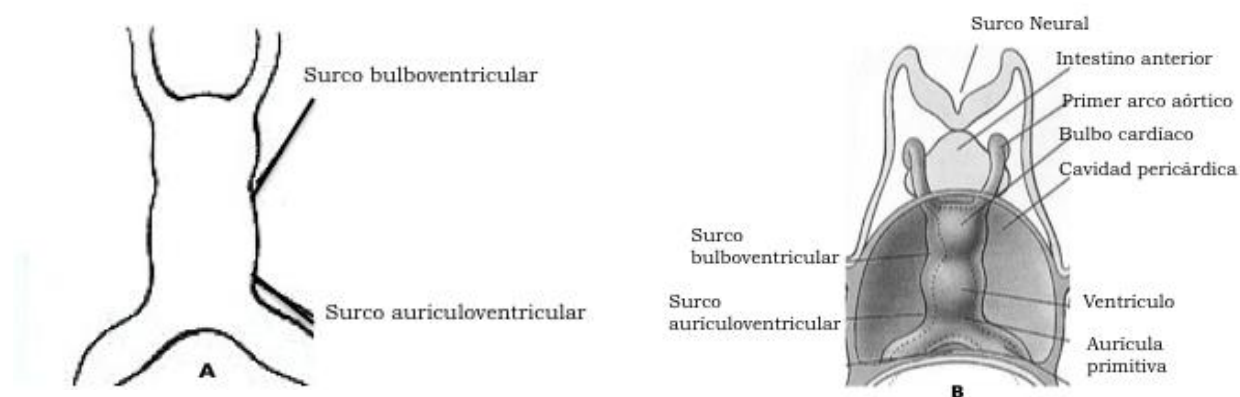


Figura 20.- Vistas ventrales del corazón primitivo durante su desarrollo embrionario a partir del 21 día de gestación. **(A)** La fusión de los dos tubos endocárdicos desde la región craneal, forma el tubo cardíaco primitivo que queda dividido en dos cavidades iniciales por los surcos bulboventricular y auriculoventricular. **(B)** División del tubo cardíaco en las regiones primitivas, precursoras de las cámaras cardíacas del corazón adulto tras el plegamiento cardíaco. Modificado de Larsen, 2003 ²¹⁵.

Otros hitos importantes en el desarrollo cardíaco son la tabicación auricular y división del canal auriculoventricular común primitivo, que suponen el primer paso en la separación de las circulaciones pulmonar y sistémica, y que comienzan ya en la 4ª SDG. Para la división de las aurículas se forman los dos *septum*, *primum* y *secundum*, que se fusionan progresivamente, aunque mantienen aperturas (*ostium secundum* y *foramen oval*) que permiten la derivación sanguínea derecha-izquierda durante todo el embarazo dentro del patrón circulatorio fetal.

La división del canal auriculoventricular (AV) se produce por el crecimiento de tejido endocárdico de la periferia de éste, dando lugar a las “almohadillas endocárdicas”, que se fusionan a finales de la 6ª SDG en el denominado *septum intermedium*, que divide al canal AV en los canales auriculoventriculares derecho e izquierdo.

La tabicación de los ventrículos coincide con la división de los tractos de salida en aorta ascendente y tronco de la arteria pulmonar y el desarrollo de las válvulas cardíacas. La división ventricular comienza a finales de la 4ª SDG con el crecimiento muscular desde el surco bulboventricular en dirección cefálica. Se detiene tres semanas después antes de que su borde libre contacte con el *septum intermedium* para permitir la conexión del ventrículo izquierdo con el tracto de salida ventricular. Esta formación del tabique interventricular coincide con el engrosamiento muscular de cada ventrículo y la formación de las *trabéculas* o *crestas miocárdicas*, que conectarán el tabique interventricular con las futuras válvulas cardíacas.

Otros acontecimientos controlados por la CN en la morfogénesis cardíaca, son la división del bulbo cardíaco y el tronco arterioso durante la 5ª SDG, proceso que dará lugar a la división de los tractos de salida en aorta ascendente y tronco de la arteria pulmonar (Figura 20). Esta división se produce a través de proyecciones troncocónicas de disposición en espiral que comienzan en el extremo inferior del tronco arterioso con crecimiento superior e inferior, hasta fusionarse con la almohadilla endocárdica inferior y con el tabique muscular interventricular y completar así la separación de los ventrículos derecho e izquierdo.

4.7.2. LOS VASOS SANGUÍNEOS. EMBRIOGÉNESIS:

Comienzan a formarse a principios de la 3ª SDG a partir del mesodermo esplacnopleural, y su desarrollo es diferente en el mesodermo extraembrionario que en el embrión. En el primero, la angiogénesis comienza el 17º día de gestación en el mesodermo esplacnopleural del saco vitelino con la formación de agrupaciones de células mesodérmicas, los “islotes sanguíneos”.

Estos islotes están formados por dos tipos de células precursoras: *los hemoblastos* (se diferencian en las primeras células sanguíneas embrionarias) y las *células endoteliales* (futuro endotelio de los vasos sanguíneos). Estos precursores vasculares se alargan y establecen comunicaciones creando una red vascular inicial que irriga el saco vitelino, el pedículo de fijación y las vellosidades coriónicas del embrión al final de la 3ª SDG.

Los vasos sanguíneos del disco embrionario comienzan a formarse un día después a partir del mesodermo esplacnopleural. Gracias a la secreción de algunas sustancias inductoras por el endodermo, algunas células del mesodermo se diferencian en angioblastos, que se transformarán posteriormente en células endoteliales planas que confluyen para formar pequeñas vesículas: “los angiocistos”²⁹⁷. A su vez éstos se unen formando largas estructuras vasculares, los cordones de angioblastos, que se distribuyen y confluyen por toda la superficie del disco embrionario para formar los “plexos angioblásticos”, es decir, la red inicial del sistema circulatorio del embrión.

4.7.3. EL SISTEMA ARTERIAL:

Los arcos aórticos son las arterias originarias que irrigan los arcos faríngeos y que darán lugar a los vasos de la cabeza y el cuello. Aparecen conforme se desarrollan los arcos faríngeos en la 4ª SDG. Son cinco pares de arterias que atraviesan de forma transversal los arcos faríngeos y desembocan en dos arterias de mayor calibre que recorren longitudinal y dorsalmente el embrión: las aortas dorsales derecha e izquierda.

Ventralmente, las arterias de los arcos aórticos se forman a partir del *saco aórtico*, una prolongación cefálica del *truncus arteriosus*. Estos arcos aórticos se suceden en dirección cefalocaudal y forman una malla de arterias alrededor de la faringe.

El primer par de arcos aórticos aparece el día 24 y regresa cuando aparece el segundo dos días después. Los arcos aórticos 3º y 4º se forman el día 28. En la tercera y cuarta semana se van desarrollando los siguientes arcos aórticos a la vez que van desapareciendo los dos primeros. Los vasos derivados de los tres primeros arcos son bilaterales y simétricos, mientras que los derivados de los arcos 4º y 6º son asimétricos (Figura 21).

Así, las arterias del primer arco desaparecen casi por completo salvo unos pequeños restos que formarán parte de las arterias maxilares, que irrigan los oídos, dientes y músculos oculares y faciales. También desaparecerán las del segundo arco, salvo unos vestigios que formarán parte de la arteria del estribo. Del tercer arco aórtico se originarán la arteria carótida común y la porción proximal de la carótida interna. La porción distal de la carótida común se fusiona con la aorta dorsal y forma la región distal de la carótida interna. La arteria carótida externa surge como un brote de la carótida interna.

El cuarto arco aórtico derecho formará el origen proximal de la arteria subclavia derecha y la región del saco aórtico conectada con esta cuarta arteria aórtica derecha dará lugar al tronco braquiocefálico. La subclavia distal procede de la aorta dorsal derecha y la séptima arteria intersegmentaria (rama de la aorta dorsal derecha). En el lado izquierdo, el cuarto arco aórtico dará lugar al arco aórtico y a la porción más proximal de la aorta descendente. La séptima arteria intersegmentaria izquierda (rama de la aorta dorsal izquierda) formará la subclavia izquierda.

El sexto arco aórtico derecho proximal persiste como arteria pulmonar derecha proximal. La zona distal involuciona. La porción proximal del izquierdo origina la parte proximal de la pulmonar izquierda. Su región distal forma el conducto arterioso, comunicación arterial entre la arteria pulmonar izquierda y la aorta dorsal.

Durante la 4ª SDG las dos aortas dorsales se fusionan a nivel del cuarto segmento dorsal hasta el cuarto lumbar formando una sola aorta dorsal en la línea media. La aorta dorsal derecha degenera en la 7ª semana, excepto su unión al 4º arco aórtico para la formación de la arteria subclavia derecha como se ha comentado anteriormente.

La aorta dorsal irriga el tracto gastrointestinal a través de ramas supradiafragmáticas para la vascularización del esófago y otras infradiafragmáticas para la de los distintos órganos abdominales a través de las arterias vitelinas (ramas ventrales que forman el tronco arterioso y las arterias mesentéricas superior e inferior) y ramas laterales para la vascularización de las glándulas suprarrenales, riñones y las gónadas. Además, origina las arterias intersegmentarias (ramas posterolaterales) desde la región cervical hasta la sacra.

A nivel cervical se fusionan para formar la arteria vertebral. A nivel torácico formarán las arterias intercostales y en la zona lumbar originarán las arterias lumbares y la iliaca común. Las arterias intersegmentarias de la región sacra dan lugar a las arterias sacras laterales y, finalmente, el extremo caudal de la aorta dorsal se convierte en la arteria sacra media. También a nivel caudal forma las arterias umbilicales, que llevan sangre poco oxigenada y productos de desecho desde el embrión a la placenta y que en la vida postnatal formarán las arterias vesicales superiores y los ligamentos umbilicales mediales.

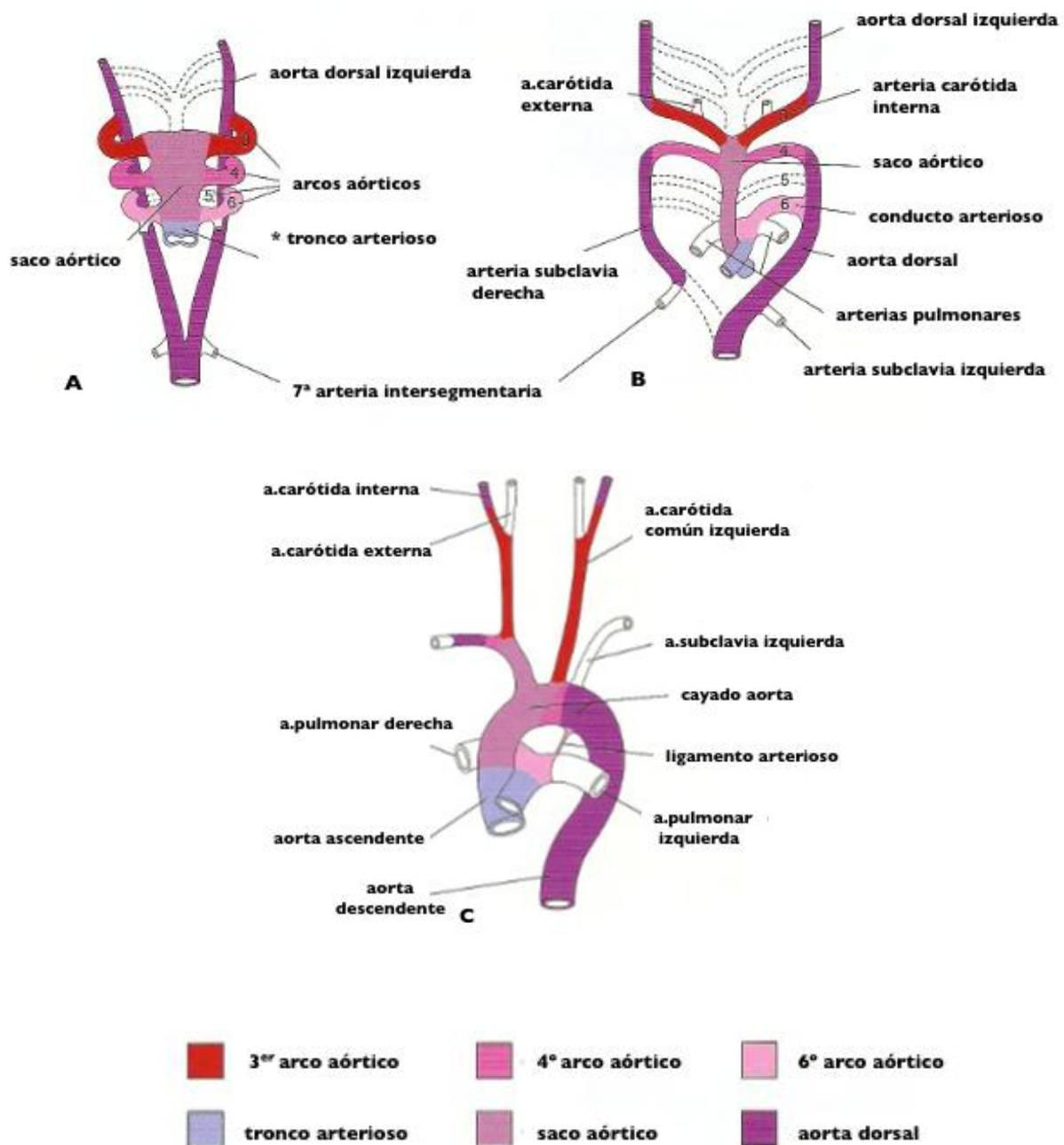


Figura 21.- Esquema en el que se representa el desarrollo arterial de la región cervicotorácica. Como puede verse, la gran parte de los arcos aórticos 1º y 2º degeneran (región punteada). El tercer arco aórtico forma las arterias carótidas común e interna derechas e izquierdas de forma simétrica. Los arcos aórticos 4º y 6º originan un sistema arterial asimétrico para formar la región proximal de la arteria subclavia derecha, el arco aórtico, aorta proximal, tronco pulmonar y conducto arterioso. En la figura (A) se representa con asterisco (*) la división parcial del tronco arterioso en aorta y arteria pulmonar.

Modificado de Moore, 2004³²

4.7.4. EL SISTEMA VENOSO

Embriológicamente, el sistema de retorno venoso cardíaco (polo venoso o “tracto de entrada”) se compone de varias estructuras anatómicas, procedentes embriológicamente de las astas sinusales derecha e izquierda. Estas estructuras incluyen la porción miocárdica proximal de las venas cava superior derecha y cava inferior, el seno coronario y el *sinus venarum*.

El drenaje venoso del embrión se realiza a partir de tres sistemas principales (Figuras 22 y 23):

- 1) Las venas vitelinas que drenan la sangre procedente del tracto gastrointestinal. Dan lugar al sistema porta, la vena mesentérica superior y la porción suprahepática de la vena cava inferior (VCI). Las conexiones vitelinas derecha-izquierda que no desaparecen forman la vena esplénica y la vena mesentérica inferior.
- 2) Las venas umbilicales, que transportan sangre oxigenada desde la placenta. La vena umbilical derecha involuciona y persiste la vena umbilical izquierda, que se transforma en el conducto venoso e involuciona tras el nacimiento en el ligamento venoso.
- 3) Las venas cardinales, que drenan las regiones de la cabeza y cuello (venas cardinales anteriores) y el tronco (venas cardinales posteriores).

Estos tres sistemas drenan al seno venoso y aunque en un principio son bilaterales y simétricos, sufren también una remodelación posterior. Así, las venas cardinales anteriores dan lugar a las venas cervicales y torácicas superiores y las posteriores forman las venas ilíacas, hipogástricas, la vena sacra media y la cava inferior a través de las venas sub y supracardinales. Éstas últimas, surgen de la transformación de las venas cardinales posteriores como dos pares simétricos de venas en posición más medial que establecen conexiones entre sí.

Las venas subcardinales drenan estructuras retroperitoneales, fundamentalmente los riñones, las glándulas suprarrenales y las gónadas. La vena subcardinal derecha origina el segmento prerrenal de la VCI. La porción longitudinal de la vena subcardinal izquierda degenera, excepto las conexiones de ésta a la derecha que forman la vena renal izquierda y vena gonadal izquierda. El segmento renal de la VCI se forma por la anastomosis de las venas subcardinal y supracardinal en ese nivel.

Las venas supracardinales se encargan del drenaje de la pared corporal a través de las venas intercostales segmentarias. La vena supracardinal derecha origina la VCI posrenal. La porción más inferior de la vena supracardinal izquierda se oblitera.

En la región torácica, las venas supracardinales forman las venas Acigos (derecha) y Hemiácigos (izquierda), que desembocan en el corazón a través de la vena cava superior.

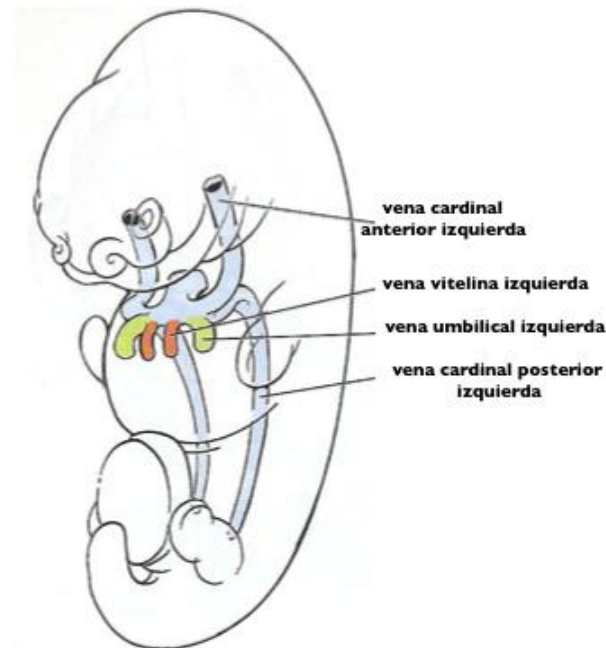


Figura 22.- Sistema venoso en el embrión de 28 días representado por las venas cardinales anteriores y posteriores, venas vitelinas y venas umbilicales, que se disponen simétricamente en ambos lados corporales. Corte sagital. Larsen, 2003 215.

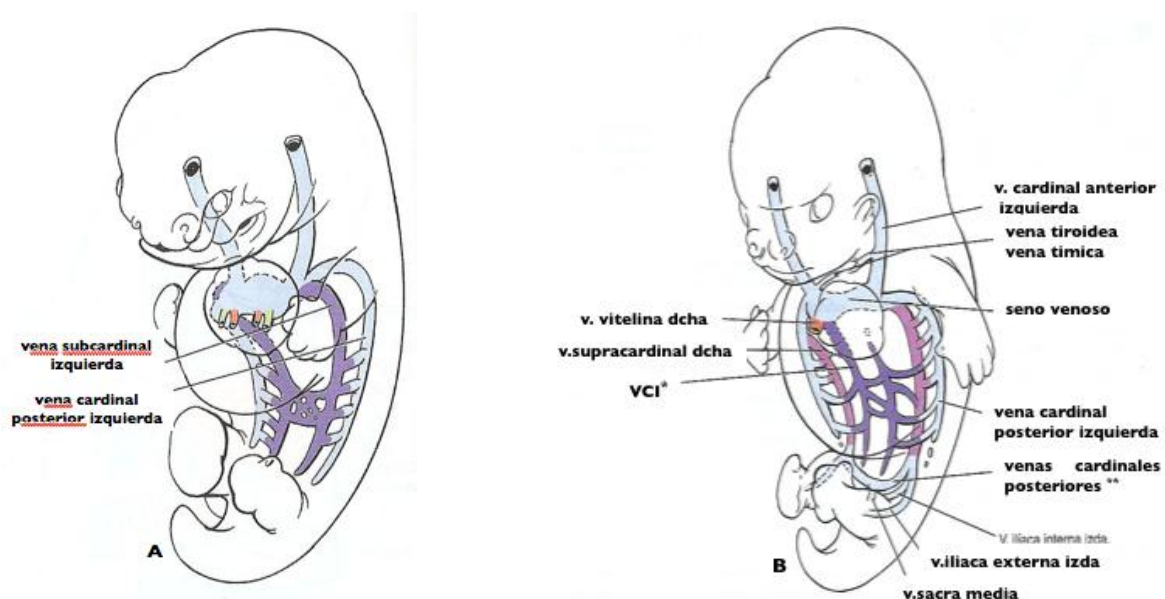


Figura 23.- Dibujos en cortes sagitales de embriones humanos que representan el desarrollo del sistema venoso durante el 2º mes de gestación. **A:** embrión de 35 días. Las V.Cardinales Anteriores (que drenan las regiones de la cabeza, cuello y tórax superior) y Posteriores (que se encargan del drenaje del tronco) y las V.Subcardinales (encargadas fundamentalmente del retorno venoso desde los órganos retroperitoneales) se disponen según un patrón simétrico a ambos lados corporales del embrión. **B:** embrión de 50 días. El sistema venoso sistémico está formado por los tres pares de venas: Cardinales, Subcardinales y Supracardinales, que darán lugar a las venas sistémicas definitivas. Las Venas Supracardinales vehiculizan el retorno venoso de la pared corporal a través de las venas intercostales, V. Acigos y Hemiácigos. **VCI***: porción subcardinal de la vena cava inferior. Tomado de Larsen, 2003 ²¹⁵

Las venas cardinales anteriores drenan en un principio en las astas sinusales. Pronto, el asta sinusal izquierda degenera para quedar en la vena oblicua de la aurícula izquierda que drena la sangre de la aurícula izquierda en el seno coronario, que deriva a su vez del asta sinusal derecho. Las venas cardinales anteriores dan lugar a las yugulares internas, y las yugulares externas se forman a partir de plexos capilares de la cara. La vena cardinal izquierda pierde su conexión con el corazón y se conecta con la vena cardinal anterior formando la vena braquiocefálica izquierda, que drena el territorio craneocervical izquierdo. La vena subclavia izquierda se forma por plexos venosos del miembro superior y desemboca en la vena cardinal anterior izquierda. El pequeño segmento de la vena cardinal derecha entre ambas venas braquiocefálicas y la aurícula derecha es la vena cava superior (Figura 24).

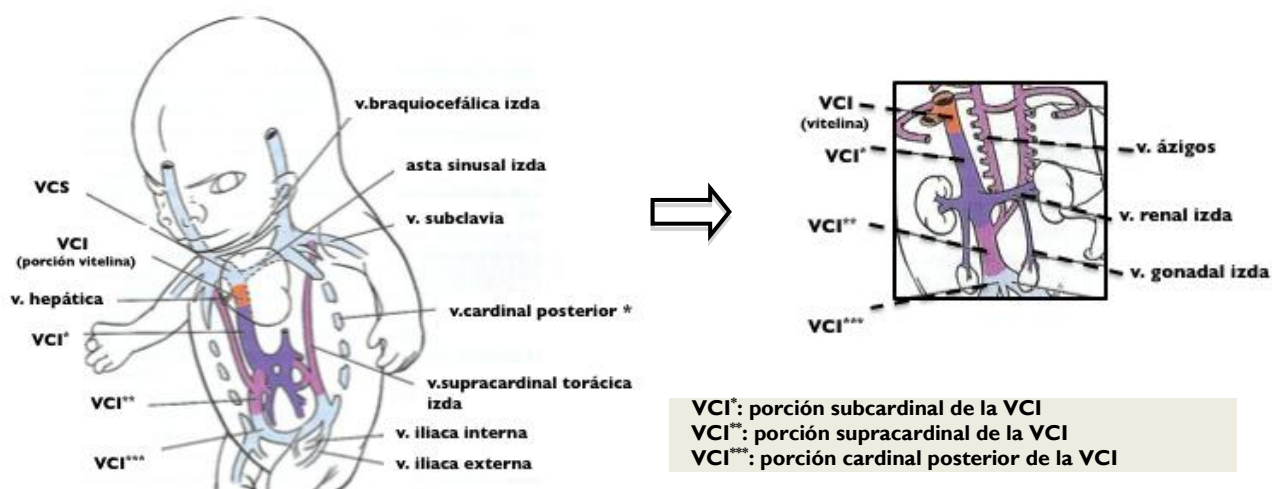


Figura 24.- Desarrollo del sistema venoso en el embrión humano (56 días de gestación) en el que se observa la transformación del patrón venoso simétrico inicial en el definitivo asimétrico por la regresión de segmentos venosos de las venas Cardinales, Subcardinales y Supracardinales. En el recuadro de la derecha se muestra el sistema venoso definitivo del período postnatal. Puede observarse la formación de la V.Cava Inferior a partir de los tres sistemas venosos en sus diferentes tramos. VCI: V.Cava Inferior. Tomado de Larsen,2003 ²¹⁵.

Debido a la falta de regresión de determinados segmentos venosos durante el desarrollo embrionario, se pueden producir malformaciones, siendo las más destacadas las citadas a continuación:

- *Vena Cava Inferior Doble:* por falta de regresión de la porción caudal de la vena supracardinal izquierda. La sangre drena en la VCI derecha a través de la vena renal izquierda o a través de la hemiácigos.
- *Ausencia del segmento hepático de la VCI:* Se forma cuando la vena subcardinal derecha no establece conexión con el hígado y desvía la sangre directamente hacia la vena supracardinal derecha, con la consecuente atrofia de este segmento. La sangre venosa retorna por la anastomosis supracardinal (sistema Acigos en el humano). Se asocia frecuentemente con otras anomalías cardíacas y con el síndrome de poliesplenia.

- *Vena Cava Superior Doble*: No regresa la vena cardinal anterior izquierda y mantiene su conexión con el corazón. Es la anomalía venosa torácica más frecuente con una prevalencia del 0,3% en la población general. Suele ser asintomática, excepto en aquellos casos en los que drena de forma anómala a la aurícula izquierda o si se asocia a otras malformaciones cardíacas.
- *Vena Cava Superior Izquierda*: persistencia de la vena cardinal anterior izquierda y obliteración de la vena cardinal común y de la porción proximal de las venas cardinales anteriores del lado derecho.

4.7.5. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN LA RATA. DIFERENCIAS EMBRIOLÓGICAS Y ANATÓMICAS^{298, 299.}

El desarrollo embrionario cardíaco y arterial es similar al descrito en el humano. El corazón comienza su desarrollo en la región anterior del embrión una vez finalizado el período de gastrulación, como un engrosamiento celular en la zona de la futura región pericárdica en la cavidad celómica intraembrionaria (*Theiler Stage* o TS 10/11). Este grupo de células forman la *placa cardiogénica*, que se diferenciará en un futuro en el miocardio .

Subyacente a ésta, otro conglomerado de células endoteliales se diferencian para formar dos estructuras tubulares: el tubo endocárdico cardíaco derecho e izquierdo, que al igual que en el humano, se fusionan en la línea media en un tubo único embebido en una matriz de gelatina cardíaca (TS 12). También como en el embrión humano, el plegamiento del embrión producirá así mismo un plegamiento progresivo de este corazón primitivo que se recubre de las células de la placa cardiogénica. Este tubo cardíaco queda formado por lo tanto por una capa celular interna de origen endotelial: el endocardio; y otra más externa originada en la placa cardiogénica: el miocardio; quedando globalmente suspendido, ventralmente al intestino anterior por una región de mesenterio: el mesocardio dorsal (TS 12) (Figura 25).

El primordio cardíaco, presenta una disposición tubular simétrica, dividido en distintos compartimentos (a partir de TS12/13), con un polo arterial ("*outflow tract*") craneal, desde donde se desarrollan progresivamente los arcos aórticos (completados en TS16), que se fusionarán con las aortas dorsales en cada lado corporal; y un polo venoso ("*inflow tract*") caudal formado por los extremos derecho e izquierdo del seno venoso ("*sinus horns*") que desembocan en la aurícula primitiva.

El plegamiento, septación y la remodelación cardíaca se desarrollan durante TS15-22, dando lugar al corazón maduro tetracameral, con una septación aortopulmonar equivalente al corazón humano.

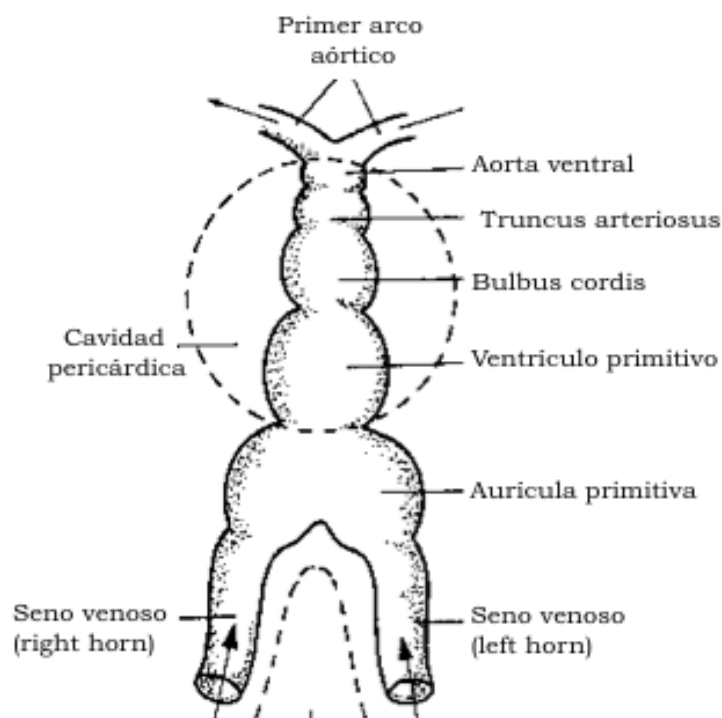


Figura 25. -Corazón primitivo (TS 12) representado como una estructura tubular. La porción más craneal (polo arterial: "outflow tract") se corresponde con la aorta ventral y los arcos aórticos y en la más caudal (polo venoso: inflow tract) se localizan los dos extremos del seno venoso ("left and right horns"). Tomado de Kaufman, 1999 299.

Las principales diferencias en el desarrollo cardiovascular entre las dos especies se centran en el desarrollo del sistema venoso, siendo la persistencia del patrón venoso simétrico en el territorio cervicofacial la diferencia fundamental en los roedores (Figura 26). Al contrario de lo que ocurre en el humano, la vena cardinal anterior izquierda no desaparece, dando lugar a persistencia de la Vena Cava Superior Izquierda. De esta forma, el territorio venoso de la cabeza, cuello y miembro superior de cada lado del cuerpo drena en su correspondiente Vena Cava Superior ipsilateral, a diferencia de lo que ocurre en humanos en los que éste drenaje se realiza a través de la vena braquiocefálica – Vena Cava Superior –Aurícula Derecha.

De esta forma, en la especie murina, la Vena Cava Superior Derecha (VCSD) drena en la región superior de la aurícula derecha, como en el humano. La Vena Cava Superior Izquierda (VCSI) pasa por delante del arco aórtico y del hilio pulmonar izquierdo, drena en la VCI a través del seno coronario (seno venoso) y de ahí a la región más caudal de la aurícula derecha (AD). Antes de la entrada en la AD, la VCSI recibe la desembocadura de la Vena Acigos, que en la rata drena la parte izquierda del tórax.

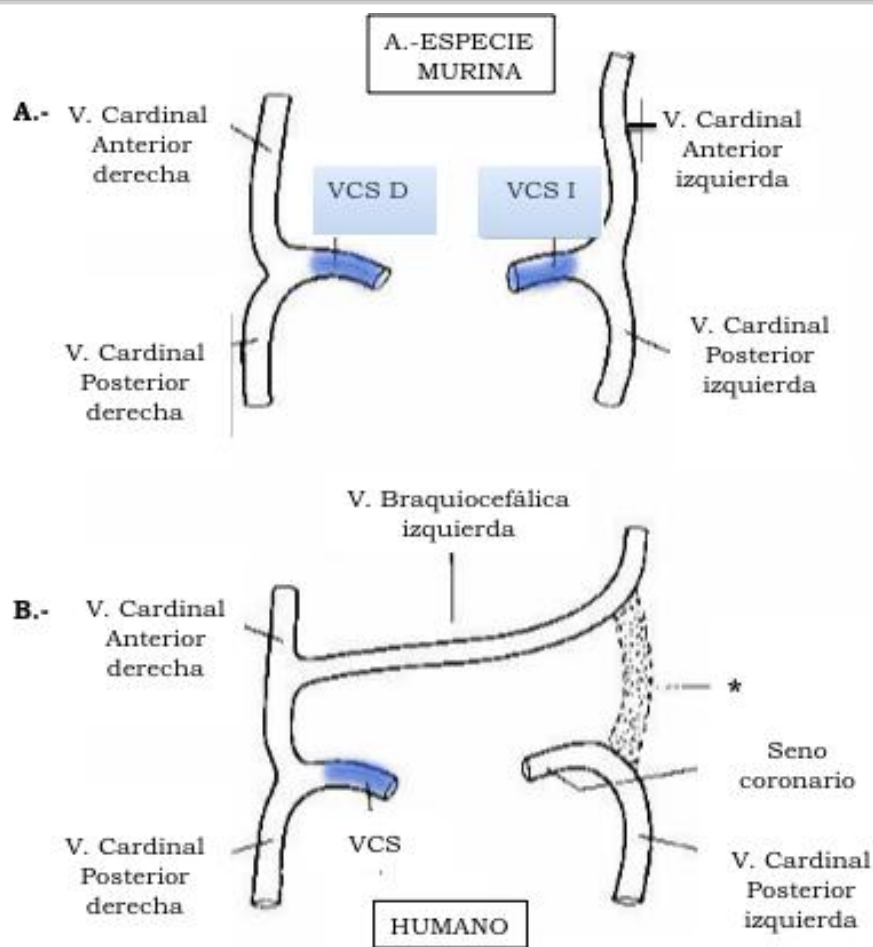


Figura 26. -Esquema que representa las principales diferencias embriológicas del sistema venoso sistémico en la rata (A) y la especie humana (B). Nótese la simetría venosa en la especie murina con dos Venas Cava Superiores: derecha e izquierda. En el humano, la Vena Cardinal Anterior izquierda regresa y la sangre del territorio venoso cervicotorácico drena en la Vena Cava Superior derecha a través de la Vena Braquiocefálica o Innominada, en un sistema anatómico asimétrico. VCS: Vena Cava Superior. (*): Porción de la Vena Cardinal Posterior izquierda que regresa en las dos especie. Modificado de Kaufman, 1999²⁹⁹.

En el período postnatal, el **drenaje venoso sistémico** de la región cervicotorácica se distribuye tal y como se describe de forma resumida a continuación (Figura 27):

1.- Las Venas Yugulares Externas: formadas a partir de la unión de la vena facial posterior y vena facial anterior en el límite entre el m. esternomastoideo y el m. trapecio, son las principales venas de drenaje del cuello. Tienen un recorrido muy superficial, y atraviesan en su 1/3 distal la clavícula para dirigirse medialmente hacia su unión con la Vena Axilar, formando la Vena Subclavia.

2.- Las Venas Yugulares Internas: con un calibre menor a las VYE, y mediales a éstas, se forman de las tributarias de las venas del occipital e inferior senos petrosos, abandonando el cráneo a través del foramen posterior. Camina dorsal al m. estilohioideo y músculos digástricos. Emerge y cruza ventral al músculo elevador de la clavícula, sigue bajando por el cuello donde recibe las venas faríngea y tiroidea. En la base del cuello cruza ventral a la arteria carótida interna y se une con la vena subclavia para formar la Vena Cava Superior (VCS) (Figura 28).

3.- Las Venas Cavas Superiores (VCS) formadas por la confluencia de la VYI y la Vena Subclavia discurren ventrales a la raíz de la arteria subclavia y descienden para drenar en la aurícula derecha. La VCSD es corta y se abre directamente en la porción anterior de la aurícula. La VCSI es larga cruzando el cayado de la aorta, los vasos pulmonares y los bronquios para entrar en la AD desde abajo con la vena cava inferior (Figura 29).

4.- La Vena Cava Inferior comienza con la unión de las v iliacas comunes, ligeramente dorsales a la bifurcación de la aorta. En su trayecto pélvico y abdominal discurre dorsal a la aorta en un principio, posicionándose en un plano más ventral a medida que asciende hasta la zona renal. Cruza el diafragma dorsal al hígado y entra en la cavidad torácica donde va separada de la aorta por el esófago. Asciende hacia la VCSD por una muesca que hace el lóbulo retrocardíaco del pulmón izquierdo para entrar en la AD.

5.- El Sistema Acigos tiene una disposición muy variable. La vena Acigos Izquierda, predominante en tamaño, discurre a la izquierda de la aorta pegada a la columna vertebral. Recibe ramas tributarias de cada espacio intercostal hasta el tercer espacio intercostal y desemboca en la VCSI. Cuando existe vena Acigos derecha, de menor calibre que en el lado contralateral, habitualmente desemboca en la VCS ipsilateral para drenar en la aurícula derecha. (Figura 30). Se ha descrito también la desembocadura de ambas venas Acigos en la VCSD, bien cada una por separado, o a través de un tronco común.

El Sistema Venoso **Pulmonar** está formado por cuatro venas pulmonares para cada lóbulo pulmonar en el pulmón derecho (superior, medio, retrocardíaco e inferior) y una en el pulmón izquierdo. Drenan el territorio pulmonar pasando dorsalmente a las V. Cavas Superiores de cada lado para entrar finalmente en la aurícula izquierda. Las venas pulmonares izquierdas son cruzadas por el cayado de la V Acigos a la entrada de la VCSI (Figura 31).

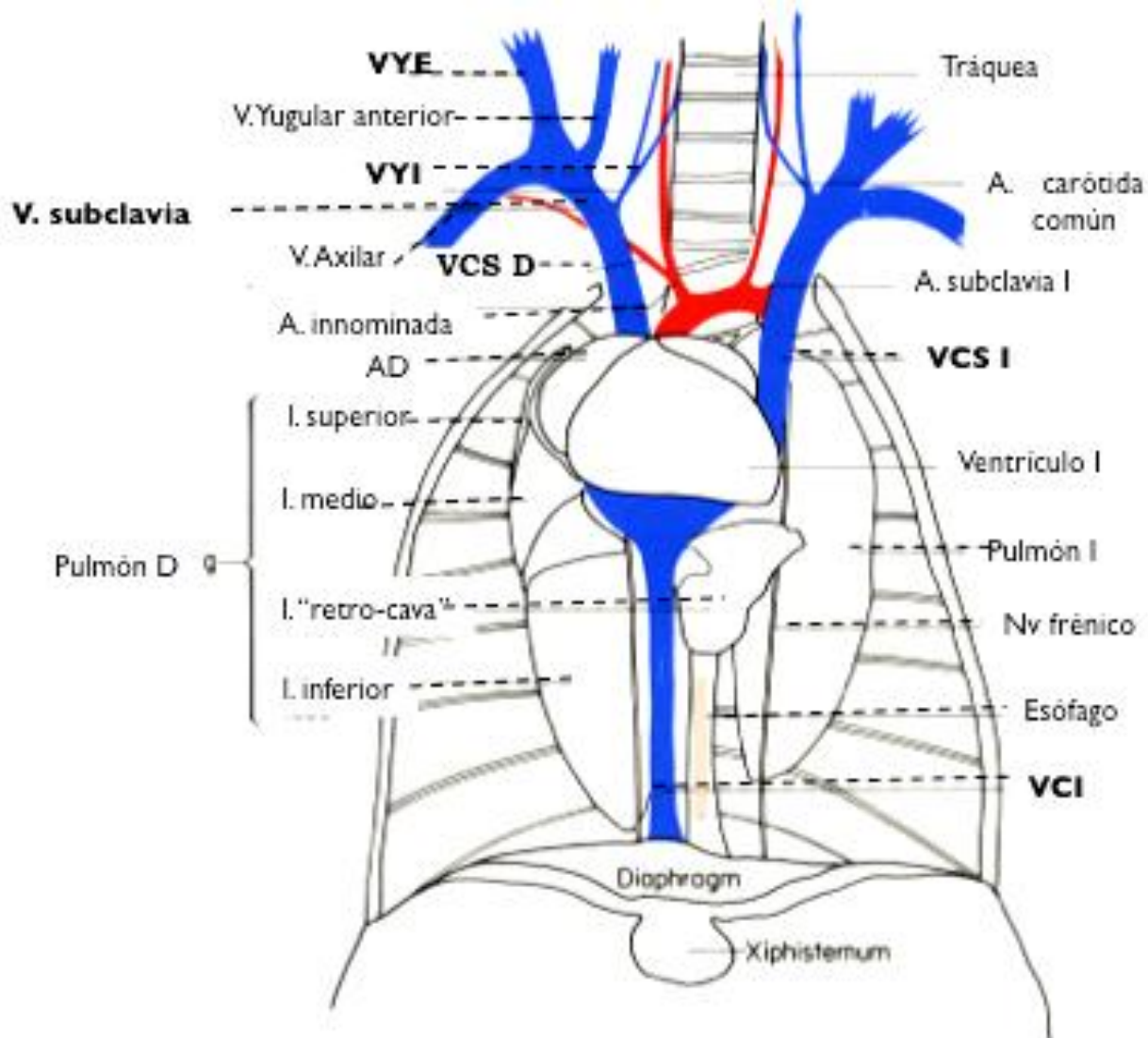


Figura 27.-Esquema del sistema venoso en la especie murina., visto desde una visión frontal, tras extirpación del timo. Como se puede observar, al contrario que en el humano: la vena yugular externa (VYE) es de mayor calibre que la vena yugular interna (VYI). Se une a la V. Axilar para formar la V.Subclavia, que drena la sangre de la región cervicotorácica ambas V.Cavas Superiores: derecha e izquierda. **VCSI:** V. Cava Superior Izquierda. **VCS D:** V. Cava Superior Derecha. **VYE:** V. Yugular Externa. **VYI:** V. Yugular Interna. **VCI:** V.Cava Inferior.



Figura 28.- Foto de disección de la región cervicotorácica de feto de rata (E=21). Se demuestra la discrepancia de calibre entre la V. Yugular Ixterna (derecha) y la V. Yugular Externa (izquierda). Con asterisco (*) se señala el timo, que se encuentra apoyado sobre las orejuelas cardíacas.

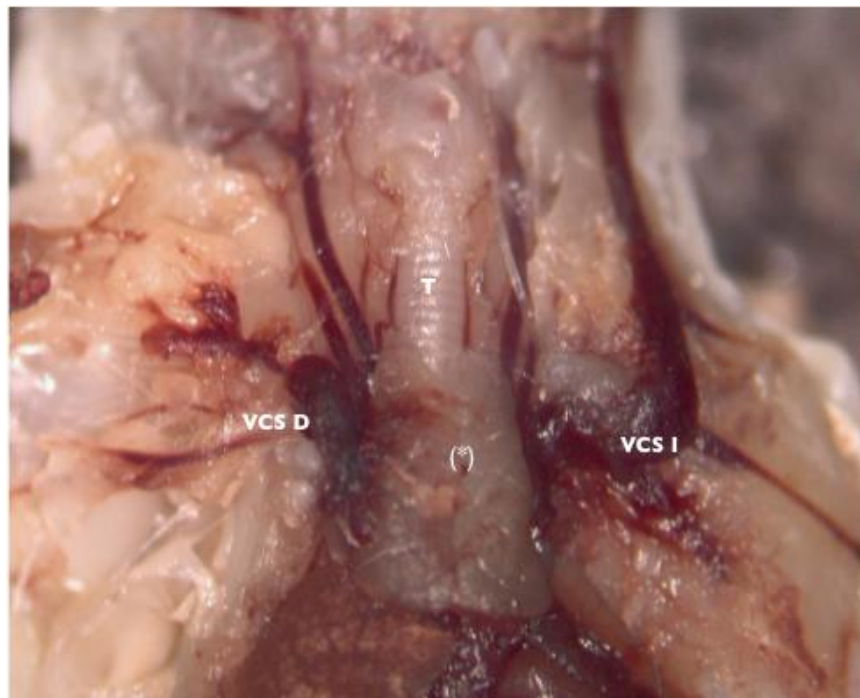


Figura 29.- Foto de disección de la región cervicotorácica en feto de rata a término (E=21). Se han extirpado las clavículas a ambos lados para mostrar las V. Cavas Superiores derecha e izquierda. (T): tráquea. (*): timo. **VCS D:** V.Cava Superior derecha; **VCS I:** V.Cava Superior izquierda.

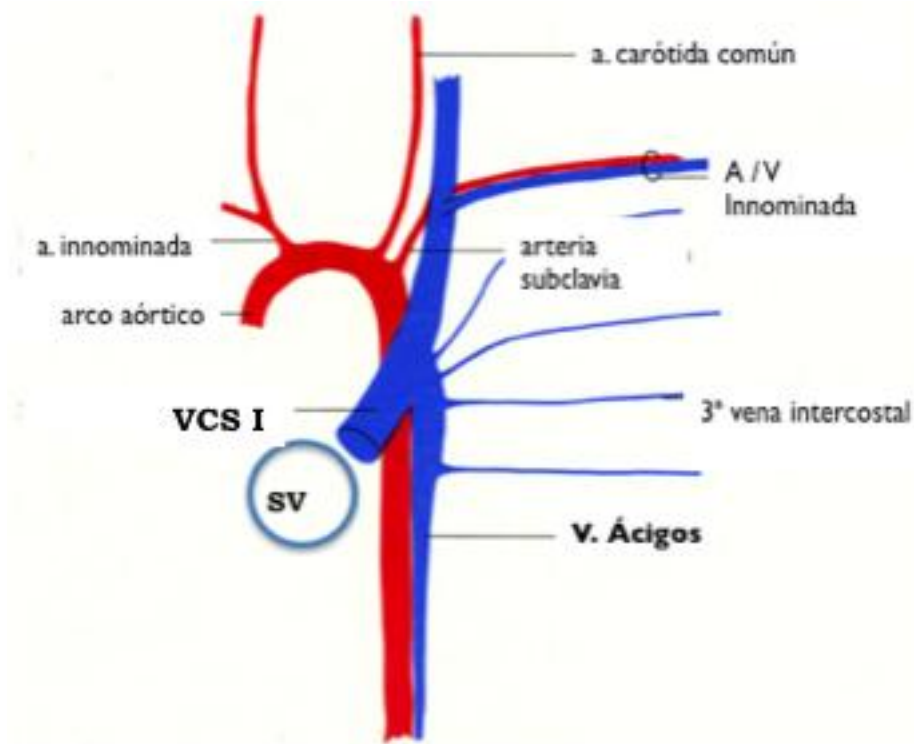


Figura 30.- Esquema en el que se muestra el drenaje torácico a través de la Vena Ácigos, que a diferencia del humano, transporta la mayor parte del drenaje venoso de la pared torácica siguiendo un trayecto a la izquierda de la columna vertebral. Desemboca en la VCSI antes de entrar en la aurícula derecha a través del seno venoso (SV).

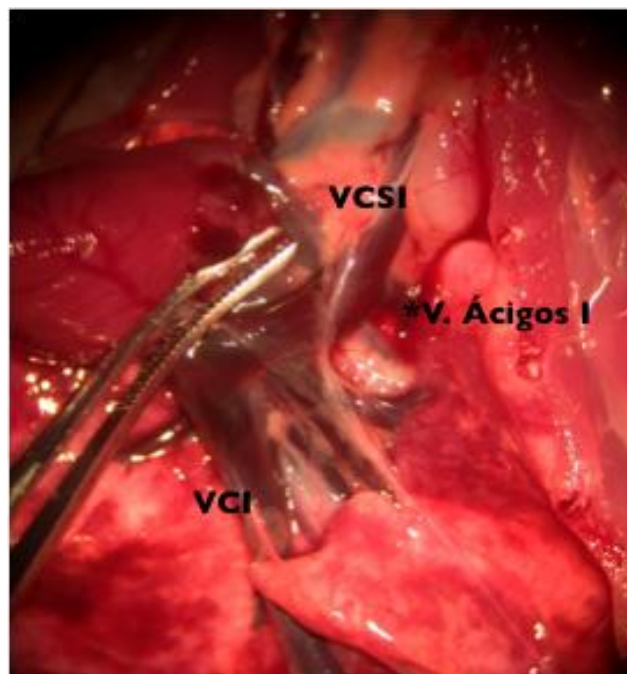


Figura 31.- Foto de disección anatómica de la cavidad torácica en un feto de rata (E=21) desde una vista frontal. Con asterisco (*) se muestra la V.Ácigos Izquierda en su unión a la VCSI antes de su entrada en la aurícula derecha. El corazón se encuentra retraído y desplazado hacia la derecha. Al fondo se observa el parénquima pulmonar con las venas pulmonares en su forma de "tridente" característica.

4.7.6. LA CRESTA NEURAL CARDÍACA:

Esta región de la CN se sitúa entre las vesículas óticas y los límites caudales del tercer par de somitos. Las células de la CN colonizan el corazón primitivo, migrando a través de los arcos faríngeos 3º, 4º y 6º hasta alcanzar las arterias de los arcos aórticos y el troncocono cardíaco en formación³⁰⁰. Regula dos etapas fundamentales del desarrollo cardíaco, como son: 1) la septación del corazón en sus tractos de salida (troncocono) para la separación de la circulación sistémica y pulmonar; y 2) la remodelación de los arcos aórticos que formarán las arterias que irrigan la cabeza, el cuello y el tórax superior³⁰¹⁻³⁰³.

Más recientemente, también se ha podido confirmar que estas células neurocristales invaden el polo venoso en una fase más tardía de la morfogénesis cardíaca, llegando hasta los cojinetes atrioventriculares, el sistema de conducción cardíaco^{304, 305} e incluso a las venas cardinales, las principales venas de entrada al corazón^{306, 307}.

Estas células de la CN se diferencian en músculo liso y pericitos en las grandes arterias cardíacas, y en neuronas para la inervación del corazón³⁰⁸. También se ha comprobado la existencia de células de la CN en las valvas de las válvulas aórtica y pulmonar y en el septo interventricular, aunque no se conoce su papel exacto.

Los experimentos con modelos quimera de ave y con ablación de regiones de cresta neural han sido de vital importancia para demostrar la implicación de la CN en el desarrollo cardiovascular³⁰⁹. Así, se han confirmado alteraciones troncoconales típicas como Ventrículo Derecho de Doble Salida, Tetralogía de Fallot, Truncus Arterioso persistente o alteraciones del desarrollo y remodelación de las Arterias Faríngeas cuando se extirpan segmentos de la CN cardíaca. Además, se han podido evidenciar alteraciones de la función miocárdica con disminución de la fracción de eyección y dilatación ventricular^{310, 311}.

El tipo de afectación cardíaca depende de la extensión de la ablación de la CNC, produciéndose anomalías en la alineación del troncocono cuando se extirpan escasas células neurocristales y afectación de la septación cardíaca cuando la extirpación es mayor³¹².

Como en el resto de las estructuras derivadas de la CN, el microambiente celular creado y regulado por señales genéticas y moleculares influye de forma determinante en la morfogénesis cardíaca³¹³⁻³¹⁵. Algunas de estas señales se exponen a continuación y se resumen en la Tabla VIII.

Pax3 es una familia de factores de transcripción que regulan la migración celular mediante la regulación de la transcripción del receptor c-met³¹⁶. El modelo murino *Spotch* (mutación en el gen Pax3) reproduce el fenotipo de ablación de la cresta neural cardíaca (truncus arterioso persistente y alteraciones de las arterias faríngeas) junto a otras anomalías neurocristales como aplasia o hipoplasia del timo y de las glándulas paratiroides³¹⁷.

Las Neurotrofinas son factores de crecimiento que regulan la supervivencia y diferenciación neuronal e interaccionan con células del tracto de salida cardíaco regulando la septación del corazón³¹⁸⁻³²⁰.

Los factores de transcripción *Forkhead* (*Fox C1/Fox C2*) se expresan en el mesodermo de la cabeza, de los arcos faríngeos y en la CN^{312, 315}.

El gen *Tbx1* y los Factores de Crecimiento Fibroblásticos (*FGF*) interaccionan también en la morfogénesis cardíaca. *TBX1* es un factor de transcripción localizado en la zona de delección 22q11 presente en pacientes con síndrome de DiGeorge^{321, 322}. Se expresa en el endodermo faríngeo, que de forma indirecta influye en la maduración de las células de la CN. Las interacciones entre el gen *Tbx1* y determinados factores de crecimiento regulan el desarrollo de las estructuras corporales de origen neurocristal^{315, 323}. Así, modelos murinos con delección de *Tbx1* (*Tbx1*^{-/-}) no expresan factores de crecimiento fibroblásticos *FGF8* y *FGF10*, influyendo en la supervivencia de las células neurocristales y dando lugar a las mismas anomalías cardiovasculares³²⁴, craneofaciales, tímicas y de las glándulas paratiroides que los pacientes con síndrome de DiGeorge³²⁵⁻³²⁷. De hecho, se ha demostrado un incremento de la apoptosis celular de las células de la CN en modelos animales con mutaciones en *FGF8*³²⁸ y más recientemente una función quimiotáctica (favorecedora de la migración) sobre las células de la CNC³²⁹. En este contexto hay que incluir también al ácido retinoico, que activa la expresión de los factores de crecimiento *FGF8* y *FGF10*³³⁰.

Los receptores *Notch* son proteínas transmembrana involucradas en multitud de procesos de diferenciación celular. Ejercen su acción mediante la unión a diversos ligandos, siendo los más destacados los de la clase *Jagged*. La señal *Notch* se ha demostrado implicada en el desarrollo cardiovascular en estudios genéticos, tanto en animales como en humanos. Mutaciones a este nivel originan defectos de septación y del tracto de salida cardíaca, como estenosis pulmonar o tetralogía de Fallot³³¹⁻³³³.

Los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, *PDGF*, están implicados también en la regulación de la migración, supervivencia y proliferación de las células de la CN. Alteraciones a este nivel producen malformaciones conotruncales, defectos de pigmentación y anomalías tímicas^{334, 335}.

Las *Endotelinas* son proteínas que se expresan en el endotelio de los vasos de los arcos faríngeos. Sus receptores se expresan en las células de la CN migratorias y en el mesénquima de los arcos faríngeos derivado de la CN. Sus alteraciones provocan cardiopatías neurocristales^{313, 336, 337}.

El Factor de Crecimiento Transformante (*TGFβ*) y las proteínas morfogenéticas del hueso *BMP*, que participan en la inducción y mantenimiento de la CN y son fundamentales en el desarrollo del tracto de salida cardíaco y del miocardio³³⁸⁻³⁴¹.

Y por último las señales ligadas al gen *Wnt*, que regulan la migración y diferenciación de vías neurocristales, fundamentalmente en el desarrollo del tubo neural y futuro sistema nervioso³⁴². También se ha confirmado su influencia en distintas fases cardiogénicas, sobre todo en relación al desarrollo del denominado “segundo campo cardíaco”, fuente del miocardio y del tracto de salida cardíaco³⁴³.

Sólo algunos (*Tbx1/Jagged*) se han demostrado implicados en la génesis de cardiopatías congénitas en humanos^{322, 331, 344}.

Genes	Categoría
<i>Alk2, Bmpr1a, BMP2, Msx2</i>	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
<i>Fgf8</i>	<i>Fibroblast growth factors</i>
<i>TGFβ2</i>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<i>Trk-C, Neurotrophin 3</i>	<i>Neurotrophins</i>
<i>Tbx1, Foxc1, Foxc2, FoxD3</i>	<i>Transcriptional regulators</i>
<i>Slug/Snail, Sox9</i>	
<i>N-CAM, N-cadherin, Connexin-43</i>	<i>Adhesions molecules</i>
<i>Jagged1, Notch2</i>	<i>Notch, Jagged</i>
<i>Wnt1, Wnt3a</i>	<i>Wnt</i>

Tabla VIII- Principales genes y señales moleculares implicados en el desarrollo de la cresta neural cardíaca.

En resumen, en este apartado se pone de manifiesto la importante función de las células de la cresta neural cardíaca en la formación del corazón y de sus polos arterial y venoso, demostrada por las anomalías cardiovasculares ocasionadas tras su extirpación o manipulación genética. Esta regulación organogénica es ejercida directamente por la CN o de forma indirecta por la interacción molecular de su microambiente celular.

4.8. LAS NEUROCRISTOPATÍAS.

Se define como neurocristopatía a la patología producida por alteraciones en cualquier fase del desarrollo de la CN: migración, crecimiento, proliferación o diferenciación de sus células. Se describió por primera vez por Bolande en 1974 para agrupar enfermedades de distinta índole (malformativas, endocrinológicas, oncológicas, etc.) pero con un mismo origen embrionario neurocristal¹⁸⁷ (Figura 32). Tradicionalmente se han clasificado en simples, si afectaban a un único tipo celular, y complejas, con afectación de distintos tipos celulares y por lo tanto distintos órganos y tejidos, como ocurre por ejemplo en las neurofibromatosis, con anomalías de las células de Schwann, manchas café con leche y tumores neuroectodérmicos¹⁸⁸. A continuación exponemos algunos ejemplos de estas neurocristopatías.

4.8.1. CARDIOPATÍAS TRONCOCONALES:

Como ya se ha comentado previamente, las relacionadas con alteraciones de la CN son las que afectan al proceso de septación conotruncal, al desarrollo de las válvulas y de los grandes vasos. A este grupo corresponden la transposición de grandes vasos, Tetralogía de Fallot, comunicaciones interventriculares (CIV), ventrículo derecho de doble salida, estenosis pulmonar o coartación de aorta^{158, 300, 301, 345, 346}.

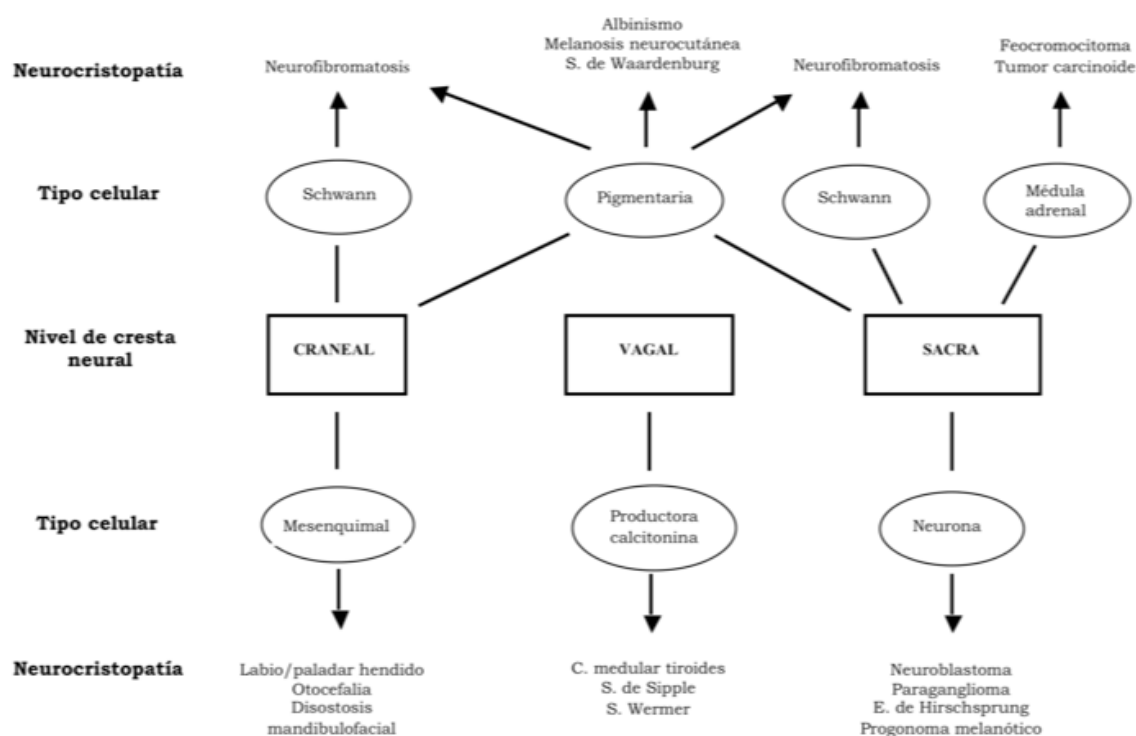


Figura 32. Clasificación de las neurocristopatías según el nivel de afectación en la cresta neural y el tipo celular alterado

4.8.2. SÍNDROME DE DELECIÓN 22Q11.2:

Fue descrito por primera vez por Angelo DiGeorge en 1968³⁴⁷. Tiene varias presentaciones que incluyen el síndrome de DiGeorge, síndrome velocardiofacial o de Shprintzen, síndrome de anomalía facial conotruncal y la aplasia tímica congénita. Se produce por la delección de una zona del brazo largo del cromosoma 22 (región q11.2) y tienen en común malformaciones cardíacas de tipo conotruncal³⁴⁸.

El *síndrome de DiGeorge* se caracteriza por la presencia de infecciones recurrentes por aplasia o hipoplasia tímica, malformaciones cardíacas troncoconales e hipocalcemia por afectación de las glándulas paratiroides.

El *síndrome velocardiofacial*, definido por Shprintzen en 1978³⁴⁹ y descrito previamente por Strong en un caso familiar en el año 1968, se caracteriza por la asociación de fisura palatina, anomalías cardíacas de tipo conotruncal, facies dismórfica, hipotonía, retraso del desarrollo con dificultad del aprendizaje y estatura baja. Las cardiopatías más frecuentes son CIV, tetralogía de Fallot y atresia o hipoplasia pulmonar³⁵⁰.

El *síndrome cardiofacial* o *síndrome de Cayler*³⁵¹ asocia cardiopatía congénita con facies de llanto asimétrico por hipoplasia del músculo triangular de los labios.

Todos estos síndromes descritos, caracterizados por anomalías faciales, cardiopatías troncoconales y microdelección 22q11 se encuadran dentro del fenotipo *CATCH 22*^{352, 353} (acrónimo del inglés **C**ardiac defects, **A**bnormal face, **T**hymic hipoplasia, **C**left palate and **H**ypocalcemia).

4.8.3. OTROS DEFECTOS CRANEOFACIALES:

Otros defectos de origen neurocristal no enmarcados dentro del síndrome de delección 22q11 son el síndrome de Waardenburg, la disostosis mandíbulo facial o síndrome de Treacher-Collins, la microsomía hemifacial (síndrome de Goldenhar-Gorlin) o la asociación CHARGE, acrónimo inglés de la asociación de **c**oloboma, **h**ear disease, **a**tresia choanae, **r**etardation of physical and mental development, **g**enital hypoplasia and **e**ar anomalies/deafness^{354, 355}.

4.8.4. TUMORES:

Algunos tumores son también neurocristopatías. Unos son de estirpe neuronal³⁵⁶ como el neuroblastoma o el neurofibroma, que cuando es múltiple y asocia afectación de las células pigmentarias de la piel, constituye la entidad conocida como neurofibromatosis. También se incluyen en este grupo los tumores del sistema APUD, formados por células sintetizadoras de hormonas polipeptídicas intestinales, por células C productoras de calcitonina en el tiroides y por otras células pancreáticas, adrenales o del cuerpo carotídeo, todas ellas derivadas de la CN³⁵⁷.

Estos tumores se asocian con frecuencia a otras enfermedades, a veces de naturaleza neurocristal, como la enfermedad de Hirschsprung, defectos de septación cardíaca o el síndrome de DiGeorge³⁵⁸⁻³⁶¹.

4.8.5. ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG:

Está producida por una alteración en la migración de las células neurocristales que deja sin colonizar un segmento más o menos largo del intestino grueso, dando lugar a la ausencia de células ganglionares nerviosas en la pared intestinal. Gracias a modelos experimentales se ha demostrado un origen genético en los casos familiares, con la implicación del protooncogén RET, compartido con otras enfermedades como el carcinoma papilar de tiroides o las neoplasias endocrinas múltiples (MEN 2A y 2B)³⁶²⁻³⁶⁴.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

1. Hipótesis conceptual:

La naturaleza de las malformaciones que se asocian a la HDC sugiere una regulación organogénica anormal por parte de la CN en su mecanismo patogénico, tanto del defecto diafragmático como de sus malformaciones acompañantes. En pacientes supervivientes podría haber disfunciones subclínicas de órganos formados bajo control neurocristal como el timo, el tiroides, las glándulas paratiroides y las células parafoliculares productoras de calcitonina, que traduzcan las malformaciones descritas en ratas con HDC.

En el modelo animal, además, podría haber alteraciones aún no descritas del sistema venoso que se sumarían a los defectos ya demostrados del sistema cardiovascular (corazón y polo arterial).

2. Hipótesis operativa:

En primer lugar, en lo que respecta a los pacientes con HDC, algunas estructuras derivadas de la cresta neural como el timo, las paratiroides o las células parafoliculares, presentarían alteraciones en su función o en su distribución anatómica. Estas alteraciones se estudiarían mediante diversas pruebas diagnósticas en el caso de los supervivientes, o partir de material proveniente de necropsias.

En segundo lugar, la anatomía venosa cervicotorácica sería anormal en los fetos de rata con HDC.

3. Hipótesis estadística

La primera hipótesis nula es que no existan alteraciones en la inmunidad celular dependiente del timo, en la distribución o el número de las células parafoliculares y en la función paratiroidea en los pacientes sobrevivientes con HDC. La hipótesis alternativa es que alguna de estas estructuras neurocristales presente anomalías demostradas mediante estudios diagnósticos anatomopatológicos o de laboratorio.

La segunda hipótesis nula es que la anatomía venosa cervicotorácica de los fetos de rata con HDC estudiada mediante resonancia magnética, sea igual a la de los fetos del grupo control. La hipótesis alternativa es que dicha anatomía presente alteraciones congénitas.

OBJETIVOS

En Humanos:

1.- Demostrar en pacientes supervivientes a HDC, posibles disfunciones de órganos formados bajo la influencia de la CN como el timo (alteraciones de la inmunidad celular), las células C tiroideas y las glándulas paratiroides, (anomalías de la homeostasis fosfocálcica y de la mineralización ósea).

2.- Estudiar en autopsias de pacientes con HDC posibles alteraciones histológicas respecto a la cantidad y/o la distribución de las células C tiroideas similares a las observadas en el modelo animal de HDC inducida con nitrofen.

En Animales:

Demostrar malformaciones del sistema venoso sistémico cervicotorácico, controlado por la CN, mediante estudios anatómicos con resonancia magnética (RM) de alta resolución, en fetos de rata con HDC.

MATERIAL Y METODOS

I. ESTUDIO CLÍNICO EN PACIENTES CON HDC

I.1. PACIENTES:

Se reclutaron 34 pacientes con HDC de los 65 censados inicialmente en nuestro Centro e intervenidos durante el período 1993-2006 (Tabla IX). Se descartaron 14 pacientes que seguían tratamientos farmacológicos, o con episodios infecciosos activos en el momento de su inclusión en el proyecto, situaciones ambas que podrían enmascarar los parámetros bioquímicos a estudio. No se pudo contactar con 11 pacientes y 6 rechazaron su participación en el proyecto. (total: 34/65).

Paciente	Sexo	Edad	Paciente	Sexo	Edad
# 1	V	16	# 18	M	3
# 2	M	15	# 19	V	4
# 3	V	13	# 20	V	3
# 4	V	11	# 21	V	3
# 5	V	8	# 22	M	2
# 6	V	8	# 23	M	2
# 7	V	3	# 24	V	2
# 8	M	7	# 25	V	11m
# 9	M	5	# 26	V	18m
# 10	V	5	# 27	V	15m
# 11	V	5	# 28	M	18m
# 12	V	4	# 29	M	18m
# 13	M	4	# 30	M	5m
# 14	M	3	# 31	V	10m
# 15	V	3	# 32	M	4
# 16	V	3	# 33	M	6m
# 17	M	2	# 34	V	7m

Tabla IX.- Características de edad y sexo de los pacientes del grupo HDC. Edad en años si no especificado.

1.2. GRUPO CONTROL:

Con el objetivo de realizar un estudio comparativo “caso-control”, se escogió de forma aleatoria un grupo control formado por 20 niños, con una distribución similar de edades y sexos a las del grupo HDC, que acudieron a nuestras consultas por otras patologías leves, no relacionadas con la hernia diafragmática, y que requerían la realización de estudios analíticos para ser sometidos a intervenciones quirúrgicas menores de forma programada (Tabla X). Ninguno de estos sujetos padecía procesos infecciosos agudos ni seguía tratamientos farmacológicos durante la participación en el estudio.

Tras ser informados y obtener el correspondiente consentimiento, fueron sometidos a las mismas pruebas analíticas (valoración de la función inmunitaria tímica y estudio del metabolismo fosfocálcico) que el grupo de pacientes con HDC. No se consideró necesaria la realización de densitometría ósea en el grupo control por la existencia de datos de referencia teóricos de normalidad de densidad mineral ósea en poblaciones pediátricas sanas en función de la edad y del sexo²⁷².

Control	Sexo	Edad	Control	Sexo	Edad
# 1	V	16	# 11	M	4
# 2	M	15	# 12	V	3
# 3	V	13	# 13	V	3
# 4	V	11	# 14	M	4
# 5	M	8	# 15	V	4
# 6	M	2	# 16	V	3
# 7	M	11	# 17	V	3
# 8	M	3	# 18	M	2
# 9	V	9	# 19	V	11m
# 10	V	7	# 20	V	2

Tabla X.- Características de edad y sexo de los pacientes del grupo Control. Edad en años si no especificado.

I.3. CONFIDENCIALIDAD Y SUPERVISIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO:

Se garantizó la confidencialidad de los datos de todos los sujetos que participaron en el estudio mediante la codificación de cada caso con un número ordinal del estudio y la codificación correspondiente acorde a la normativa vigente de protección de datos de carácter personal.

Se elaboró un protocolo de actuación para la totalidad del estudio clínico que fue revisado y aprobado por el correspondiente Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro hospital con el expediente HULP CI-577 (Anexo I: autorización del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital La Paz).

I.4. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON HDC:

El seguimiento de los participantes se realizó de forma ambulatoria en las Consultas Externas de Cirugía Pediátrica coincidiendo mayoritariamente con sus revisiones periódicas. Se concertó telefónicamente una cita extraordinaria con aquellos que no tuviesen programado un seguimiento clínico en nuestro servicio durante el periodo a estudio.

En la primera visita todos los pacientes y sus familias (o tutores) fueron informados detalladamente de las características y pretensiones del proyecto de forma verbal y escrita mediante una *Hoja de Información* administrada a los padres y al propio paciente según su edad. Así mismo, se consideró imprescindible la firma del Consentimiento Informado por la familia o el paciente (en el caso del “menor maduro” a partir de los 12 años) al inicio del estudio. Ambos documentos fueron validados y autorizados por el Comité Ético de nuestro Centro (Anexo II: hojas de información y consentimiento informado del Estudio).

Para la valoración clínica se elaboró un protocolo de estudio para un seguimiento idéntico en todos los pacientes, que hiciera objetivo y equiparable el análisis final de los mismos y que permitiese, además, consultar la situación en la que se encontraba cada participante registrando las pruebas realizadas (con su fecha correspondiente) o pendientes, en cualquier momento del estudio (Anexo III: protocolo de estudio)

En esta primera visita se realizó la entrevista clínica y una exploración física detallada, insistiendo en los aspectos que consideramos importantes en el seguimiento de la enfermedad y en la valoración e interpretación final de nuestros resultados, siendo los más importantes:

- a) Sintomatología respiratoria.
- b) Clínica digestiva (reflujo gastroesofágico, u otros síntomas digestivos derivados de una posible malrotación intestinal o de la propia intervención quirúrgica).
- c) Coexistencia de otras malformaciones.
- d) Infecciones de repetición.
- e) Tratamientos farmacológicos.
- f) Desarrollo psicomotor /neurocognitivo.
- g) Presencia de deformidades torácicas.

h) Antropometría general: Se recogieron los valores de peso (kg) y talla (cm), y se realizó una valoración del estado nutricional mediante el cálculo de los índices de Shukla y Waterlow^(*), que relacionan el peso, la talla y la edad ³⁶⁵. En esta valoración, se introdujeron los datos de edad, sexo, peso (kg) y talla (cm) de cada paciente en la página web destinada a valoraciones antropométricas y nutricionales (www.webpediátrica.com/endocrinoped) elaborada por el Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil La Paz. Así se obtuvieron los valores de percentil (p) y desviación estándar (DE) del peso y de la talla en cada paciente, en relación a los valores de una población pediátrica normal tomada como referencia, extraída de los *Estudios Españoles de Crecimiento 2010*³⁶⁶.

(*): Cálculo de los índices nutriciales:

<p><u>Indice de Shukla:</u></p> $\frac{\frac{\text{Peso (kg) actual}}{\text{Talla (cm) actual}}}{\frac{\text{Peso (kg) en } P_{50}}{\text{Talla (cm) en } P_{50}}} \times 100$	<p><u>Indice de Waterlow para la talla:</u></p> $\frac{\text{Talla real (cm)} \times 100}{P_{50} \text{ talla (cm) para la edad}}$
<p><u>Indice de Waterlow para el peso:</u></p> $\frac{\text{Peso real (kg)} \times 100}{P_{50} \text{ peso (kg) para la edad}}$	

I.5. EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS:

I.5.1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA TÍMICA:

Para la cuantificación de las poblaciones linfocitarias, en los controles y en los pacientes con HDC, se realizó extracción de sangre periférica en tubo con EDTA para su estudio en el Laboratorio de Inmunología mediante Citometría de Flujo con la utilización de un citómetro de flujo tipo FACSCalibur y un software específico CellQuest (BD Biosciences), para el análisis de los datos.

Con esta técnica se estudió el fenotipado linfocitario mediante el análisis de marcadores de superficie celular a través del uso de anticuerpos monoclonales específicos marcados con Isotiocianato de Fluoresceína y/o Ficoeritrina (BD Biosciences, San Diego, California, USA)³⁶⁷. Se cuantificó el porcentaje con respecto a los linfocitos totales, y los números absolutos de las siguientes subpoblaciones linfocitarias T: CD3; CD4 (con las subpoblaciones CD4Ra y CD4Ro), CD8 (con las subpoblaciones CD8Ra y CD8Ro), CD1 (timocitos corticales) y el marcador de activación linfocitaria T: CD45+CD3+DR. Además se midieron los porcentajes de las células NK (CD3⁻CD16+CD56+) y de los linfocitos B (CD19), también en relación a los linfocitos totales.

Para la cuantificación de linfocitos totales se realizó un hemograma de la muestra de sangre periférica; que se empleó también para el cálculo de los valores absolutos (nº de células/ μ l) de todas las subpoblaciones linfocitarias citadas anteriormente, a partir de sus porcentajes y de los linfocitos totales.

La interpretación y análisis de los resultados se realizó según dos procedimientos:

- 1) En primer lugar, se tomaron como referencia los valores teóricos de normalidad según los distintos grupos etarios (0-3m, 3-6m, 6-12m, 1-2 años, 2-6 años, 6-12 años y 12-18 años) definidos en una población pediátrica sana americana, recogida en el estudio observacional del Grupo de Trabajo de Ensayos Clínicos Pediátricos de SIDA (*The Pediatric AIDS Clinical Trials Group: PACTG*) realizado durante el período 1999-2001³⁶⁹. En cada sujeto, se consideraron normales los valores porcentuales y absolutos que se situaban dentro de los límites de normalidad establecidos para su edad, según esta población de referencia.
- 2) En segundo lugar, se realizó un estudio descriptivo de todas las poblaciones linfocitarias estudiadas en cada caso, en ambos grupos, en valores absolutos y en porcentaje, incluyendo después un análisis estadístico comparando las medias mediante métodos paramétricos (ver apartado de Análisis Estadístico al final de Material y Métodos)

I.5.2. ESTUDIO DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO

Para la valoración de la función integrada de las Células C y las glándulas paratiroides, se estudió el metabolismo fosfocálcico mediante el análisis bioquímico en sangre u orina de:

- Calcio Total sérico: sus concentraciones fueron cuantificadas según un método espectrofotométrico de orto cresoftaleina complexona en un analizador Olympus AU5400 (Beckman Coulter).

- Calcio Iónico sérico (Ca^{2+}) medido por potenciometría mediante electrodo selectivo en un analizador ABL90 (Radiometer). Según nuestro laboratorio, se consideraron valores normales de calcio total plasmático: niveles entre 8,4-10,4 mg/dl; y de calcio iónico: valores entre 1,12 -1,32 mmol/l. Consideramos estos valores para los sujetos mayores de 12 años. En los menores de esta edad tomamos como referencia los límites recomendados según las guías K/DOQI²⁶⁵ (Tabla IV).

- Calciuria en orina de 24h expresada en mg/kg/día. Se consideraron normales valores de calcio urinario < 4 mg/kg/día. En aquellos casos en los que no fue posible la recogida de orina de 24h, se calculó el Cociente: Calcio/Creatinina (mg/mg) en orina de micción, como cálculo alternativo a la calciuria de 24h, según la siguiente fórmula:

$$\text{Ca}_o/\text{Cr}_o = \frac{\text{Calcio}_o \text{ (mg/dl)}}{\text{Creatinina}_o \text{ (mg/dl)}}$$

Los niveles normales del Cociente Ca_o/Cr_o (mg/mg) en orina de micción varían en función de la edad tal y como se muestra a continuación:

Edad	Índice calcio/Cr
0-6 meses	< 0,8
7m-1 a	< 0,6
1-2 a	< 0,5
> 2 años	< 0,21

- Fósforo en suero: se midió con el método espectrofotométrico de fosfomolibdato y lectura UV en un analizador Olympus AU5400 (Beckman Coulter). En los niños > 12 años se tomaron como valores normales los ofrecidos por nuestro laboratorio y en los de menor edad, los recomendados por las guías K/DOQI²⁶⁵ (Tabla IV).

- Reabsorción tubular de Fosfatos: RTP (%): para la valoración de la eliminación de fósforo urinario, se consideraron valores normales RTP > 75%-80%³⁷⁰.

.- PTHi sérica: las concentraciones fueron medidas usando un método de enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente en un analizador Immulite 2500 (Siemens Healthcare), siendo los valores de referencia normales de nuestro laboratorio 12-65 pg/ml.

.- Vitamina D en suero (Calcidiol): medido mediante enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente en un analizador Architect i2000m (Abbott Diagnostics). La evaluación del estado de vitamina D se realizó según los siguientes valores:

Deficiencia: <15 ng/ml
 Insuficiencia: 15-30 ng/ml
 Suficiencia: 30-100 ng/ml
 Toxicidad: >100 ng/ml

.- Calcitonina: medición mediante un método de enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente en un analizador Immulite 2500 (Siemens Healthcare), con valores de referencia de hasta 8,4 pg/ml en varones y hasta 5,0 pg/ml en mujeres. El límite de sensibilidad analítica es de 2 pg/ml.

.- Marcadores de Formación Ósea:

Fosfatasa Alcalina (FA) en suero: las concentraciones fueron cuantificadas usando el método espectrofotométrico de paranitrofenilfosfato con tampón AMP en un analizador Olympus AU5400 (Beckman Coulter), siendo los valores normales para la población pediátrica los siguientes:

Fosfatasa alcalina (UI/L)	
1-3 años: 104-345	1-3 años: 108-317
3-6 años: 93-309	3-6 años: 96-297
6-9 años: 86-315	6-9 años: 69-325
9-12 años: 42-362	9-12 años: 51-332
12-15 años: 74-390	12-15 años: 50-162
15-18 años: 52-171	15-18 años: 47-119

Osteocalcina: Su cuantificación en suero se realizó como el resto de los parámetros analíticos, en ayunas durante las primeras horas de la mañana, coincidiendo con su ritmo circadiano. Se midió mediante un método de enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente en un analizador Immulite 2500 (Siemens Healthcare), siendo los valores normales de <22 ng/ml en la población pediátrica, y entre 3,2 -12,2 ng/ml para el resto de la población.

Para la confirmación de una adecuada función renal en todos los participantes del estudio, ésta se valoró mediante el cálculo del filtrado glomerular (FG) según la fórmula de Schwartz, que calcula el Filtrado Glomerular Estimado (FGE) expresado en ml/min/1,73m² en función de la talla y de una constante (k):

$$\text{FGE} = \frac{\text{TALLA (cm)} \times K}{\text{Creatinina}_{\text{plasma}} \text{ (mg/dl)}} \quad (\text{ml/min}(1,73\text{m}^2))$$

Valor de K según edad:

- < 1 año: k = 0,45 (RNPT: K = 0,33)
- > 1 año: K = 0,55
- varones > 14 años: k = 0,7

Se considera un filtrado glomerular normal cuando el FGE es > a 90ml/min/1,73m².

1.5.3. ESTUDIO DE LA MASA ÓSEA: DENSITOMETRÍA ÓSEA

Medimos la Masa Ósea mediante la Densidad Mineral Ósea (DMO) resultante del estado de neoformación y resorción óseas, y dependiente del metabolismo fosfocálcico y de las hormonas que lo regulan (PTH, Calcitonina y Vitamina D fundamentalmente). Para ello, se realizó en todos los pacientes Densitometría Radiológica de doble energía (DEXA) a nivel lumbar L2-L4, en el Servicio de Medicina Nuclear de nuestro hospital. Se utilizó un densitómetro óseo modelo HOLOGIC® (QDR-1000-X-ray) en todos los pacientes. Por consideraciones técnicas se desestimó la realización de densitometría ósea en niños menores de 1 año de edad.

Los pacientes fueron explorados en decúbito supino con elevación parcial de las extremidades inferiores para conseguir una óptima separación de las vértebras lumbares. No se administraron medicaciones sedantes para la inmovilización, requiriéndose medidas físicas sólo en aquellos de menor edad. Todos los estudios se realizaron con un tamaño de pixel de 1,2 x1,2 mm y se utilizaron programas de software Lunar® versiones 3.4 y 3.5 (Lunar corp, Madison, EEUU).

Se obtuvieron mediciones del área vertebral explorada (L2-L4) expresada en cm² y del contenido mineral óseo en gramos de hidroxapatita en dicha área. En un paciente portador de gastrostomía en el que ésta interfería la correcta valoración del nivel de L2, se calculó el área vertebral sólo en L3-L4.

Los valores de *densidad mineral ósea* (DMO) en relación al área vertebral proyectada se recogieron en gramos de hidroxapatita/cm² y posteriormente se transformaron en Z-score específicos para la edad y sexo, tomando como referencia los datos de una población pediátrica sana española²⁷² que ofrece los datos de DMO en medias (M) y desviación estándar (DE) por rangos de edad y sexo.

Para el cálculo de la puntuación Z-score real se tomaron los valores de DMO del paciente, y la M y DE de la población de referencia según la siguiente fórmula:

$$Z\text{-score} = \frac{DMO - M_T}{DE_T}$$

M_T : media de DMO en la población de referencia (teórica)

DE_T : DE de la población de referencia (teórica)

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TIROIDES EN AUTOPSIAS DE PACIENTES CON HDC

2.1. PACIENTES:

Tras la aprobación por el Comité Ético de nuestro centro (HULP CI-577), y a partir del registro de autopsias del Servicio de Anatomía Patológica, se estudiaron las preparaciones histológicas de los tiroides de 12 pacientes con HDC y de 11 niños fallecidos por otra causa carentes de malformaciones, como grupo control. Uno de los pacientes con HDC fue diagnosticado de Síndrome de Fryns y otro de Trisomía 18.

Los pesos (HDC=2,63±0,97kg vs Controles=2,99±0,47kg, *n.s.*) y edades gestacionales (HDC=37,6±3 SDG, Controles=38,9±2 SDG, *n.s.*) de ambos grupos eran similares, con una tendencia menor en el grupo HDC, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas, tal y como se muestra en el siguiente gráfico:

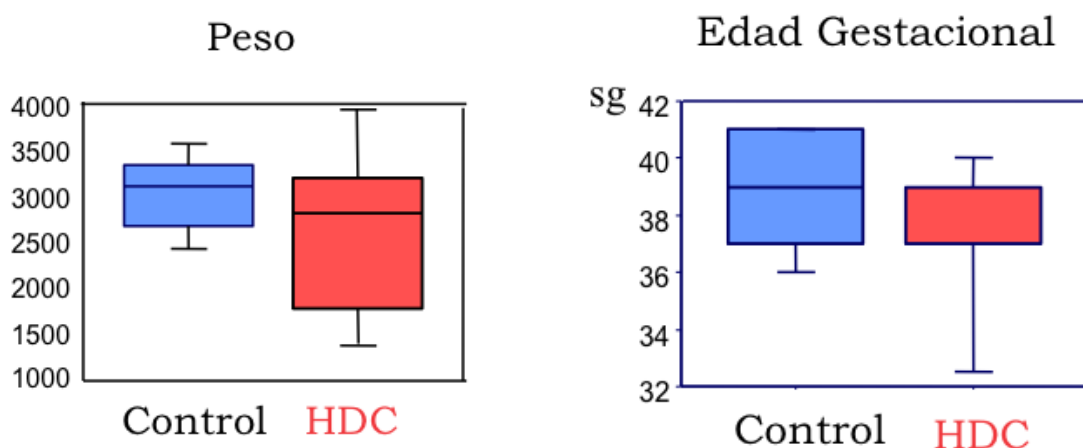


Figura 33: Diagramas de cajas en los que se muestran el peso en gramos y la edad gestacional en semanas (medianas y cuartiles) de los pacientes con HDC y de los del grupo Control. Aunque puede observarse una tendencia de menor peso y menor edad gestacional en los pacientes con HDC, la comparación entre ambos grupos no demuestra diferencias estadísticamente significativas en relación a estos dos parámetros ($p > 0,05$).

En la siguiente tabla se enumeran los pesos y edades gestacionales correspondientes a las autopsias de los pacientes con HDC y de los del grupo control, expresado en gramos (g) y semanas, respectivamente:

Paciente	Peso (g)	EG (SG)	Control	Peso (g)	EG (SG)
HDC1	2900	39	C1	3300	41
HDC2			C2	2700	41
HDC3	3190	38	C3	2600	39
HDC4		39	C4	3340	41
HDC5	1750	39	C5	3400	40
HDC6	4390	37	C6	3130	37
HDC7 ⁽¹⁾	1380	37	C7	2100	37
HDC8	2750	41	C8	3100	39
HDC9 ⁽²⁾	1300	28	C9	3800	39
HDC10	2850	39	C10	2650	
HDC11	3550	39	C11	2870	35
HDC12	2350	27			

Tabla XI: Pesos (g) y edades gestacionales (SG) de los pacientes (grupo HDC) y controles (grupo C) incluidos en el estudio anatomopatológico de las células C tiroideas. (1): paciente HDC7 presentaba trisomía 18. (2): paciente HDC9: Síndrome de Frys.

2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA:

Se recuperaron los bloques de parafina conservados en el Servicio de Anatomía Patológica de los tiroides correspondientes a todos los pacientes (HDC y Controles) y se obtuvieron cortes transversales de 7 micras de grosor, comprobando que incluían ambos lóbulos tiroideos y el istmo entre ambos. Se empleó la técnica de inmunoperoxidasa como tinción inmunohistoquímica. Así, las muestras histológicas, desparafinadas y rehidratadas, se trataron con peróxido de hidrógeno para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Se incubaron en suero de cabra diluido para bloquear reacciones con anticuerpos inespecíficos y finalmente se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpo anti-calcitonina de conejo (Dako Diagnostic, Glostrup, Denmark), según metodología descrita previamente^{163, 371}.

2.3. CONTAJE CELULAR:

Para la cuantificación de células productoras de calcitonina (CC), se dispusieron los cristales de las muestras histológicas en un microscopio Olympus Cx40 (Olympus, Hamburgo, Alemania). Se utilizó una cámara con software específico (Image Pro Plus®, Media Cybernetics, USA) adaptada a este microscopio para la obtención de imágenes digitales de dichas muestras. Se captaron imágenes a 400 aumentos de toda la glándula para el estudio de áreas con alta magnificación en la que toda la imagen estuviese ocupada por parénquima tiroideo y evitar así zonas de parénquima tiroideo vacías de células C, que interfiriesen en el conteo celular final.

Debido al gran tamaño de las muestras histológicas, cada una quedaba dividida en múltiples áreas de parénquima tiroideo a estudio (micras^2), cuya suma se correspondía con el área total tiroidea de ese corte histológico. Mediante el software de análisis de imagen citado, se midieron estas áreas inmunohistoquímicamente teñidas por campo de gran aumento, obteniéndose el sumatorio de todas éstas en cada muestra histológica.

Dicho sumatorio se relacionó con la superficie tiroidea total de cada muestra, con el objetivo de corregir las diferencias en los tamaños de las distintas muestras histológicas. Finalmente, la medida utilizada para el análisis estadístico fué el porcentaje de la superficie inmunohistoquímicamente teñida en relación a la sección tiroidea total.

Cada área fué contada en tres ocasiones en tres momentos distintos del estudio y el observador desconocía en todo momento los datos de filiación del paciente y por supuesto, a qué grupo del experimento pertenecía. También se hizo una valoración cualitativa mediante el estudio de la disposición y distribución de las células C dentro de la glándula tiroidea (dentro de cada muestra).

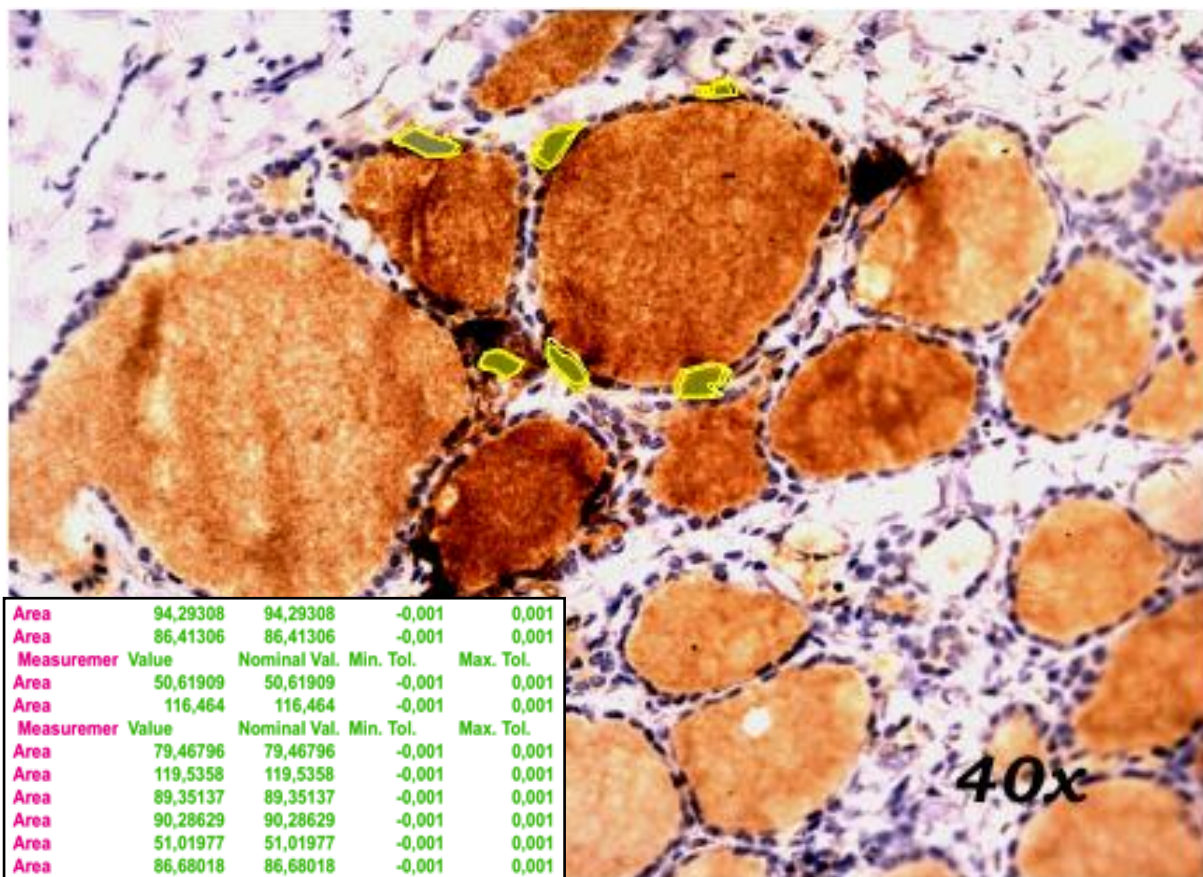


Figura 34.-Cuantificación de superficie teñida con anticuerpo anticalcitonina en una zona de la sección del parénquima tiroideo correspondiente a un paciente con HDC. Las líneas amarillas dibujan áreas (micras^2) inmunohistoquímicamente que se corresponden con células C teñidas con Anticuerpo anticalcitonina. En el recuadro inferior se muestra el recuento de las distintas áreas, de las que se obtendrá el sumatorio final de la totalidad del parénquima tiroideo de la muestra histológica (micras^2). Microscopio Olympus Cx40 (Olympus, Hamburgo, Alemania). Imágenes tomadas con cámara digital Image Pro Plus, Media Cybernetics, USA. Software: Image Pro Plus v5.0.1, Media Cybernetics, USA

3. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS. MALFORMACIONES CERVICOTORÁICAS

3.1. ANIMALES:

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras de 220-250 g de peso y machos con fertilidad probada, alojadas en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid, alimentadas con granulado especial para rata y agua de bebida “*ad libitum*”. Su manejo se ajustó a las exigencias de la UE vigentes (EC 86/L609) y a las recogidas en el RD 1201/2005. Las hembras se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales en función de la administración de teratógeno (grupo HDC=9) y placebo (grupo Control=5).

3.2. FECUNDACIÓN CONTROLADA:

Las hembras se enjaularon con machos (3x1) para fecundación durante una noche tras 24 horas de contacto visual y olfativo. El momento en el que el frotis vaginal demostró la presencia de espermatozoides se consideró el día 0 de la gestación.

3.3. ADMINISTRACIÓN DEL TERATÓGENO:

El día 9,5 de la gestación se administró a las madres del grupo nitrofen una dosis de 100 mg del teratógeno en 1ml de aceite de oliva por vía intragástrica. Los animales del grupo Control recibieron en el mismo momento, también a través de sonda nasogástrica, una misma dosis de aceite de oliva como excipiente (placebo).

3.4. OBTENCIÓN Y EXAMEN DE LOS FETOS:

La extracción de los fetos se realizó mediante cesárea el día 21 de la gestación (término: día 22) en todos los casos, tras lo cual se llevó a cabo el sacrificio de las madres por exposición a gases anestésicos en cámara apropiada. Después de cada cesárea, los fetos se trasladaron inmediatamente al edificio de Investigaciones Biomédicas del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), anejo al Hospital Universitario La Paz, donde se sometieron a los estudios de imagen por Micro-Resonancia Magnética (Micro-RM). Antes de iniciar cada exploración radiológica, todos los fetos fueron pesados en la misma báscula situada en la sala de exploración.

3.5. GRUPOS EXPERIMENTALES:

- Grupo HDC: 19 fetos de ratas expuestas a nitrofen en los que se confirmó la presencia de HDC.
- Grupo Control: 11 fetos de ratas tratadas con placebo, sin HDC.

3.6. ESTUDIOS DE MICRO-RESONANCIA MAGNÉTICA:

- ❖ *Equipo de RM:* Cada feto fué examinado individualmente en un equipo de RM de 7 Teslas (Bruker Medical, Ettlingen, Germany), equipado con un campo magnético blindado horizontal, situado en el Edificio de Investigaciones Biomédicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) anejo a la Facultad de Medicina de la UAM.



Figura 35.- A.- Equipo de RM : Bruker Medical, Ettlingen, Germany de 7 Teslas (T) empleado para las exploraciones radiológicas de todos los animales de experimentación. El sistema Bruker contiene un imán superconductor refrigerado con helio y nitrógeno. B.- Mismo equipo en el que se señala el compartimento en el que se coloca el animal al que se va a realizar la exploración con RM. C.- Detalle de la figura B.

- ❖ **Secuencias utilizadas:** En una primera valoración se aplicaron secuencias coronales rápidas spin eco (SE) con saturación grasa y múltiples cortes, con un tiempo de repetición (TR) largo y un tiempo de eco efectivo (TE) corto. Con estas secuencias, se demostró la presencia o ausencia de hernia diafragmática, asignando cada feto al grupo HDC o control, respectivamente (Figura 36). Con el objeto de obtener una descripción anatómica detallada focalizada en las estructuras cervicotorácicas y cardiovasculares, se emplearon posteriormente en cada caso, secuencias de alta resolución SE potenciadas en T2 en los planos axial, coronal y sagital.

El tamaño de la matriz fué de 256 x 256 con campo de visión de 22x22mm y una resolución de 200 DPI (*dots per inch* o puntos por pulgada), con un tamaño de píxel de 25x25. Se empleó un TR de 1.500 a 3567ms, un TE de 49,2ms con un tren de ecos (*ET: Echo Train*) de 8. El grosor de imagen aplicado fué de 0.5mm con una distancia entre los cortes de -0.5mm.

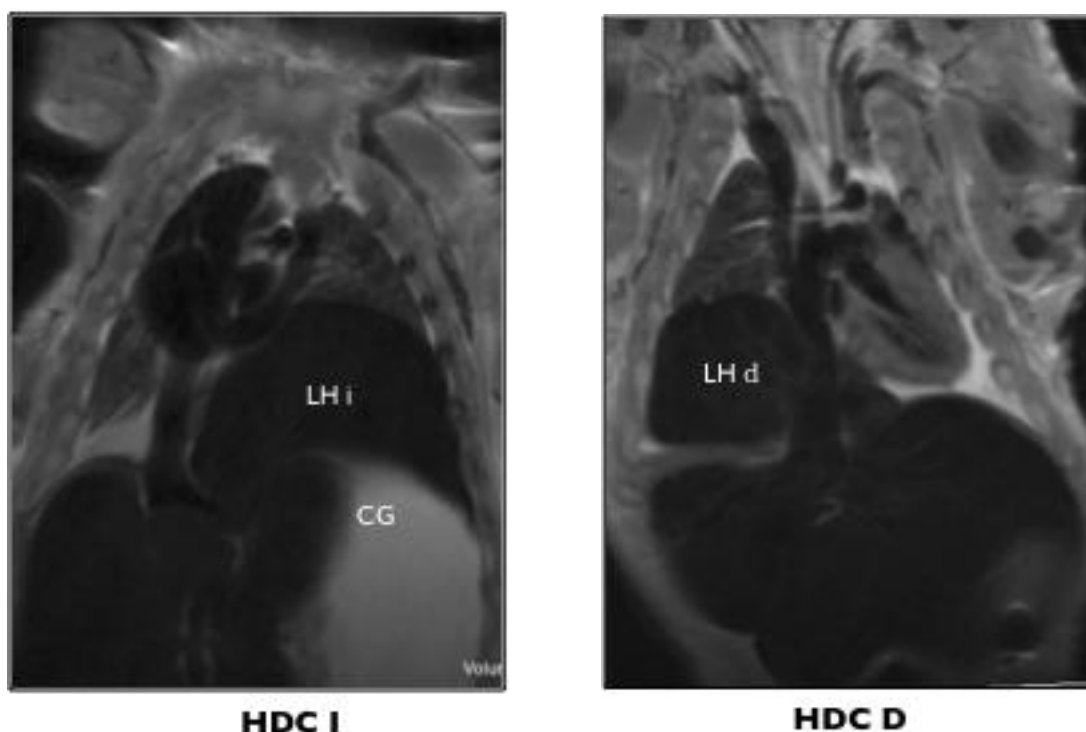


Figura 36.- Imágenes de RM de dos fetos con HDC obtenidas mediante secuencias coronales rápidas spin eco (SE) con TR largo y TE corto. En la imagen de la izquierda se observa una hernia diafragmática izquierda (HDC I) con herniación de hígado y estómago en la cavidad torácica. En la imagen de la derecha se confirma la presencia de una HDC derecha en la que se ha producido herniación del lóbulo hepático derecho. **LH i:** lóbulo hepático izquierdo; **CG:** cámara gástrica; **LH d:** lóbulo hepático derecho.

- ❖ **Imágenes:** Las imágenes se archivaron en formato DICOM (*Digital Imaging and Communication in Medicine*). Para su interpretación y análisis se utilizó el software: Image-J 1.41 (National Institutes of Health, USA) con el que se consiguieron reconstrucciones multiplanares (MPR) ortogonales y oblicuas para el estudio detallado de todas las estructuras a estudio.

Cada estructura anatómica fué identificada y analizada tomando como referencia el atlas de imágenes de RM en 4D del desarrollo murino que trata las distintas etapas embrionarias y del período neonatal³⁷².

- ❖ *Variables* Se tomaron como variables los parámetros que se citan a continuación en ambos grupos (HDC y Control), a excepción del defecto herniario, presente únicamente en los fetos con HDC

Defecto diafragmático: en todos los fetos con HDC se valoró la localización del orificio diafragmático: derecha (D) o izquierda (I), contenido herniario; y dimensiones en mm según los diámetros en los planos transversal (T) y sagital (S).

Timo: Descripción morfológica y medición de su tamaño (mm) según sus diámetros longitudinal (L), transverso (T) y anteroposterior (AP).

Árbol Traqueobronquial (Vía Aérea inferior): descripción morfológica del trayecto traqueal y bronquial.

Pulmones: estudio de la existencia de hipoplasia pulmonar en función de sus características parenquimatosas y dimensiones en ambos lados (D/I), según los planos anteroposterior, transverso, y longitudinal (AP, T y L).

Aparato Cardiovascular:

- Presencia o ausencia de *malformaciones cardiovasculares* (MCV).
- *Corazón*:
 - Aurículas: medición de los diámetro AP y T (mm)
 - Ventrículos: medición del grosor de la pared del Ventrículo derecho (VD), Ventrículo izquierdo (VI) y del septo interventricular (SIV) expresado en mm.
 - Diámetro transverso (mm) a nivel del tracto de entrada de ambos ventrículos.
 - Ductus arterioso persistente: presencia o ausencia. Localización y medición en el plano transversal (mm).
- *Sistema Arterial*:
 - *Aorta*: disposición anatómica y medición de los diámetros transversales a nivel de aorta ascendente; arco aórtico y aorta descendente a nivel del hiato esofágico.
 - *Arterias Pulmonares*: disposición anatómica y medición de diámetros transversales del tronco de la arteria pulmonar, arteria pulmonar derecha y arteria pulmonar izquierda.
- *Sistema Venoso*:
 - *Venas Sistémicas*: descripción de su disposición (recorrido) anatómica. Medición de sus diámetros (mm) en el plano transversal; excepto en el caso de la Vena Cava Inferior (VCI), proximal a la desembocadura de las venas suprahepáticas, que por razones estrictamente anatómicas se midieron en el plano anteroposterior:
 - Venas Yugulares Externas (D/I)
 - Venas Yugulares Internas (D/I)
 - Venas Axilares (D/I)
 - Tronco Braquiocefálico (D/I)
 - Venas Cavas Superiores, VCS (D/I)
 - Venas Acigos (D/I): a nivel del cayado

- Vena Cava Inferior: en la región *suprahepática* (siempre distal a la desembocadura de las venas suprahepáticas) se midió según su eje transversal (T) y en su porción *infrahepática* (*proximal a la desembocadura en las VSH*) se tomaron las medidas en el plano anteroposterior (AP).
- Venas Pulmonares: disposición anatómica. Medición del diámetro transversal del colector único (mm) por el que desembocan las venas pulmonares a la aurícula izquierda (AI), cranealmente a la VCS izquierda.

Normalización de variables: Para evitar sesgos derivados de la discrepancia en el tamaño de los animales de los dos grupos experimentales que pudieran influir en las medidas anatómicas, se normalizaron los valores absolutos obtenidos de las mediciones de todas las estructuras a estudio. El volumen tístico se relacionó con la altura de la tercera vértebra cervical (C3), y las estructuras cardiovasculares con la distancia comprendida entre el límite superior del cuerpo de la 3ª vértebra torácica y el inferior de la 5ª vértebra torácica (T3-T5). Todas las distancias fueron tomadas en mm.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Estudio Descriptivo: Las variables cualitativas se describieron en valores de frecuencia de aparición en números absolutos y en porcentajes. Las variables numéricas de cada grupo fueron tratadas estadísticamente por métodos descriptivos convencionales, expresadas en las medidas de centralidad y dispersión habituales según correspondía al tipo de variable y su distribución teórica (medias y desviaciones estándar para variables normales y medianas y rangos para las demás).

- Estudio Analítico: Los datos fueron almacenados en hojas de cálculo EXCEL (Microsoft, Office 2000) y procesados mediante el paquete estadístico StatView 4.0 y/o con Epidat 4 (disponible en http://www.sergas.es/MostrarContidos_N3_T01.aspx?IdPaxina=62713), ambos para Windows. Los resultados de ambos grupos se compararon mediante métodos estadísticos paramétricos (t-Student) o no (Mann-Whitney), de nuevo en función de la distribución de la variable y siempre considerando un valor p menor de 0,05 como nivel de significación estadística.

RESULTADOS

I. ESTUDIO CLÍNICO EN PACIENTES CON HDC:

I.1. CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE. MORBILIDAD ASOCIADA:

De los 34 pacientes con HDC, 20 (59%) eran varones y 14 (41%), mujeres, con edades comprendidas entre los 6 meses y los 16 años de edad, tal y como se resume en la Tabla IX del apartado Material y Métodos correspondiente al estudio clínico.

Doce de los pacientes con HDC (35,3%), presentaban otras malformaciones asociadas, que se resumen a continuación:

PACIENTE	MALFORMACIÓN
# 1	CIV Estenosis pulmonar Hipospadias
# 9	Hemivértebra torácica
#13	Riñón multiquístico
#14	Válvula aórtica tricúspide
#18	Estenosis pieloureteral
#19	Ectopia renal
#20	Trisomía 22 CIV. CIA Malformación cuerpo calloso
#24	CIV Secuestro pulmonar Agenesia renal
#25	Malformación anorrectal
#30	Síndrome Down CIV. CIA
#31	Arco aórtico derecho
#33	Anillo vascular complejo

Tabla XII: Malformaciones asociadas entre los pacientes del grupo HDC.
CIV: comunicación interventricular. CIA: comunicación interauricular. *El paciente 20 fue diagnosticado de “Síndrome de Emanuel”: trastorno genético caracterizado por trisomía del cromosoma 22, discapacidad intelectual grave, dismorfismo facial, cardiopatía congénita y anomalías renales.

Durante el seguimiento de los pacientes en nuestras consultas confirmamos que 6/34 (17%) padecieron procesos respiratorios manifestados como cuadros de bronquiolitis, broncoespasmo ó neumonías de repetición durante los dos primeros años de edad, con una tendencia a la mejoría progresiva en todos los casos.

Dos pacientes (#11 y #17) en los que se confirmó hipoplasia pulmonar gammagráfica, requirieron tratamiento con oxigenoterapia domiciliaria durante el primer año de edad, presentando hiperreactividad bronquial y neumonías de repetición durante su evolución. En el momento de la valoración a los 7 y 8 años respectivamente, ambos se encontraban asintomáticos, sin limitación respiratoria para sus actividades de la vida diaria y con buena función pulmonar medida mediante espirometría, necesitando tratamiento únicamente con broncodilatadores a demanda y tratamiento corticoideo ocasional durante episodios de broncoespasmo que coincidían con episodios alérgicos en uno de ellos (#11).

El paciente #24, con hernia derecha y secuestro pulmonar ipsilateral y en el que se practicó neumonectomía derecha asociada a la reparación del defecto diafragmático, presentó varios cuadros de bronquiolitis y fue diagnosticado de hiperreactividad bronquial moderada durante el primer año de edad. En la actualidad recibe tratamiento episódico con budesonida y broncodilatadores, aunque no en el momento de la inclusión en el estudio.

En cuanto a complicaciones digestivas, 19/34 pacientes (56%) presentaron clínica de RGE con necesidad de tratamiento farmacológico y de éstos, 7/19 (37%) se trataron quirúrgicamente mediante la realización de una funduplicatura de Nissen. Además, 3/34 pacientes sufrieron cuadros de obstrucción intestinal, uno de ellos tras haberse además reintervenido por recidiva de la hernia diafragmática que había sido tratada mediante sustitución protésica.

En 3/34 pacientes se detectó retraso en la adquisición del lenguaje oral y un caso fue diagnosticado de trastorno de hiperactividad y déficit de atención. No se diagnosticaron problemas auditivos en ninguno de los pacientes de nuestra serie.

En 8/34 pacientes (22%) se detectó algún tipo de deformidad torácica con los diagnósticos de: pectus excavatum (2), escápula alada (1) y escoliosis (5). Todos los pacientes con escoliosis se encuentran en seguimiento por el Servicio de Traumatología, no habiéndose indicado tratamiento quirúrgico en ninguno de los casos hasta el momento.

El grupo control, formado por 12 (60%) varones y 8 (40%) niñas, mostraban una distribución por edad y sexo similar la del grupo de nuestros pacientes (Tabla XIII). Ninguno de los participantes del grupo control seguía tratamientos farmacológicos;. Dos de los 20 (10%) tenían clínica de broncoespasmo estacional coincidiendo con episodios alérgicos y una niña padeció un cuadro de neumonía aislada a los 5 años de edad. Tampoco se diagnosticó RGE, retraso en el desarrollo psicomotor, ni deformidades torácicas en este grupo.



		HDC		CONTROL		p
Edad (a) (Mediana; rango)		3a (16-0,5)		4a (16- 0,9)		ns
Sexo	 	(20/34) 59%	(14/34) 41%	(12/20) 60%	(8/20) 40%	ns
Peso < P₂₅	Talla < p₂₅	22/34 (65%)	11/31 (35%)	1/20 (5%)	2/20 (10%)	
Peso (kg) media \pm DE	Talla (cm) media \pm DE	16,67 \pm 9,78	102,42 \pm 26,27	23,45 \pm 14,20	110,91 \pm 32,69	p< 0,05
Desarrollo psicomotor		3/34		0		ns
Sordera neurosensorial		0		0		ns
RGE		19/34		0		p< 0,05
Neumopatía		6/34 (17%)		3/20 (15%)		ns
Deformidad torácica		8/34		0		s

Tabla XIII. Resumen de las características epidemiológicas y clínicas de los componentes de ambos grupos.

1.2. FUNCIÓN INMUNITARIA TÍMICA:

En cuanto a la cuantificación del tamaño de cada subpoblación linfocitaria en función de la edad, respecto a valores teóricos de referencia³⁶⁹, se encontraron algunas alteraciones puntuales en pacientes individuales:

- **#HDC33:** fue el paciente con más hallazgos; se observaron alteraciones en los linfocitos totales (2790/ μ l;15,7%) y en la mayoría de las subpoblaciones linfocitarias;; CD3: 1450,8/ μ l; 52% (N=2500-5600/ μ l; 51-77%); CD4: 1060,2/ μ l;38% (N=1800-4000/ μ l; 35-56%); CD4Ra: 585,9/ μ l; (N=1300-3700/ μ l) CD8: 334,8/ μ l;12%(N=590-1600/ μ l;12-23%); CD8Ra: 334,8/ μ l (N=550-1400/ μ l).
- **#HDC1:** Linfocitos Totales: 1330/ μ l; 17,4% (N=1400-3300/ μ l;18-48%); CD4Ra :133/ μ l (N=230-770/ μ l) y CD8Ra :212,8/ μ l; (N=240-710/ μ l)
- **#HDC27:** CD8Ra: 454,1/ μ l (N=490-1700 / μ l)
- **#HDC30:** CD4Ra: 902 / μ l (N= 1300-3700 / μ l). Linfocitos B: 530,6/ μ l; 10% (N=430-3000/ μ l; 14- 37%).

Además, se obtuvieron alteraciones puntuales únicamente en las cifras porcentuales de poblaciones linfocitarias aisladas:

- **#HDC2:** NK: 35%;(N=3-22%)
- **#HDC7:** CD8: 12% (N=16-30%)
- **#HDC9:** CD8: 43% (N=16-30%);
- **#HDC16:** Linf B: 34% (N=14-33%);
- **#HDC28:** NK: 21% (N=3-15%).

Se descartó el estudio del fenotipado linfocitario en el paciente #HDC26 por presentar cifras anormalmente elevadas de leucocitos (27.910/ μ l) en probable relación con episodio infeccioso.

En el grupo Control sólo se detectaron variaciones de la cuantificación absoluta linfocitaria en la medición puntual de los linfocitos B en el sujeto #C8 (Linfocitos B: 375/ μ l; N=390-1400/ μ l) y en los linfocitos totales de #C16 (1780/ μ l; N=2300-5400/ μ l). En dicho grupo, se detectaron además alteración del porcentaje de los linfocitos T CD8 en #C3 (36%; N=18-35%). Todos los participantes del estudio (HDC y Controles) mostraron un valor normal de 0% en la cuantificación relativa de la subpoblación CD1, correspondiente a timocitos corticales.

En el anexo IV se muestran todos los valores de los linfocitos totales, de las subpoblaciones linfocitarias T y de los linfocitos B y células NK, correspondientes a cada paciente del grupo HDC y a los controles.

Los resultados del análisis estadístico en relación a la cuantificación linfocitaria en valores absolutos, obtenidos en M y DE, en ambos grupos, se resumen en la Tabla XIV. Como puede observarse en dicha tabla, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la cuantificación de linfocitos totales en el grupo de edad 2-6 años (HDC: 3988,33 \pm 1294,45 vs Control: 2645 \pm 928,44, $p=0,02$); de CD8Ro en <2 años (HDC: 88,8 \pm 76,99 vs Control: 243,28 \pm 141,14, $p=0,04$) y de Linfocitos B en el grupo de 2-6 años (HDC: 856,43 \pm 436,53 vs Control: 479,29 \pm 184,26, $p=0,02$).

	CONTROL	HDC	p
LINFOCITOS T			
< 2 años	3813,33 ± 1035	4052,77 ± 1567,3	0,8
2-6 años	2645 ± 928,44	3988,33 ± 1294,45	0,02
>6 años	2317,5 ± 854,6	2335 ± 718,44	0,9
CD3			
< 2 años	2348,5 ± 887,79	2651 ± 1517,3	0,7
2-6 años	2086,23 ± 771,7	2789,72 ± 901,21	0,19
>6 años	1747,9 ± 298	1496 ± 760,8	0,4
CD4			
< 2 años	1472,37 ± 501,3	1647,23 ± 614,87	0,6
2-6 años	1170,90 ± 502,81	1463,07 ± 858,66	0,5
>6 años	941,06 ± 160,36	783 ± 272,7	0,2
CD4Ra			
< 2 años	715,39 ± 202	1125,81 ± 466,85	0,13
2-6 años	794,11 ± 454,7	976,69 ± 538,7	0,4
>6 años	429,59 ± 240,43	441,22 ± 225,6	0,93
CD4Ro			
< 2 años	428,86 ± 9,8	342,77 ± 152,9	0,1
2-6 años	299,01 ± 63,88	321,63 ± 125,5	0,6
>6 años	374,71 ± 143,53	279,6 ± 25,8	0,13
CD8			
< 2 años	732,12 ± 203,45	885,21 ± 455,88	0,5
2-6 años	730,27 ± 297,28	892,88 ± 472,81	0,4
>6 años	668,87 ± 196,73	585,35 ± 197,11	0,51
CD8Ra			
< 2 años	513,62 ± 286,23	646,2 ± 310,65	0,48
2-6 años	602,03 ± 252,98	774,85 ± 313,15	0,24
>6 años	557,11 ± 220,89	455,76 ± 288,93	0,47
CD8Ro			
< 2 años	243,28 ± 141,14	88,8 ± 76,99	0,04
2-6 años	188,23 ± 66,81	188,72 ± 146,38	0,99
>6 años	209,99 ± 108,73	209,15 ± 44,86	
Linfocitos B			
< 2 años	476,88 ± 181,86	651,15 ± 390,95	0,37
2-6 años	479,29 ± 184,26	856,43 ± 436,53	0,02
>6 años	321,46 ± 86,67	391,27 ± 141,10	0,38
NK			
< 2 años	455,22 ± 384,71	332,46 ± 135,88	0,58
2-6 años	212,10 ± 83,84	342,67 ± 234,89	0,12
>6 años	237,66 ± 117,36	404,10 ± 189,86	0,10

Tabla XIV.- Cuantificación de las poblaciones linfocitarias medidas por citometría de flujo en los pacientes con HDC y en los Controles. Los valores se muestran en media±desviación estándar. La columna de la derecha muestra el valor p del test estadístico de comparación entre Pacientes y Controles para cada subpoblación. **Linfocitos T:** linfocitos totales.

1.3. METABOLISMO FOSFOCÁLCICO:

Los niveles plasmáticos de calcio y fósforo fueron normales en todos los pacientes. En orina, los niveles de fosfatos tampoco presentaron alteraciones, y en cuanto al calcio, tanto la calciuria de 24h como el calcio en orina de micción calculado mediante el índice Ca_0/Cr_0 , se situaron dentro de los niveles de normalidad de nuestro laboratorio. El valor medio del índice Ca_0/Cr_0 en el grupo de pacientes con HDC fue de $0,18 \pm 0,15$ mg/mg y en los controles $0,18 \pm 0,12$ mg/mg (*n.s.*). Todos los pacientes y controles del estudio presentaban una buena función renal, estimada según el filtrado glomerular (FGE), que fue >90 ml/min/1,73m² en todos los casos. Los resultados de todos estos parámetros se resumen en las Tablas XV a XVII.

La Paratohormona (PTH_i) en plasma estaba elevada en dos pacientes (#HDC1=126 pg/ml y #HDC33=100 pg/ml), que además tenían niveles insuficientes de vitamina D₃: 5ng/ml y 20ng/ml, respectivamente. En otros dos la PTH_i era inferior al valor normal (#HDC7=10 pg/ml: #HDC9=7 pg/ml), con niveles suficientes de vitamina D₃ (63 ng/ml) en HDC7 y niveles insuficientes (21 ng/ml) en el paciente #HDC9. El resto de los pacientes mostraron niveles correctos de PTH_i. Dos niños del grupo control mostraron bajos niveles de PTH_i (#C14: 6 pg/ml y #C15: 8 pg/ml) con niveles suficientes de vitamina D₃ (60 ng/ml y 59 ng/ml, respectivamente).

La vitamina D₃ estaba en niveles insuficientes (<30 ng/ml) en 24/34 (70%) pacientes y en 9/19 (47%) controles, con valores medios de vitamina D₃ de $26,26 \pm 11,6$ ng/ml y $32,36 \pm 15,68$ ng/ml, respectivamente, (*n.s.*).

La Calcitonina se encontró elevada en dos pacientes (#HDC23= 16,9 pg/ml y #HDC34= 12,8 pg/ml en 22/34 (65%) se informó como indetectable (NSD) y en 10/34 con valores dentro de los límites normales. En el grupo control, 13/20 (65%) tenían cifras indetectables de CT y en el resto éstas eran normales.

En cuanto a los Parámetros de Formación Ósea, 4/30 pacientes mostraron niveles elevados de FA (#HDC16= 339 UI/L, #HDC28= 290 UI/L, #HDC31= 297 UI/L y HDC34= 290 UI/L) y en 16/31 (52%) se detectaron niveles elevados de Osteocalcina. En el grupo control, 3/20 mostraron elevación de F.A y 14/18 (77%), de osteocalcina. Los niveles medios de osteocalcina en los pacientes eran de $16,51 \pm 10,43$ ng/ml y en los controles $19,97 \pm 10,19$ ng/ml, (*n.s.*).

1.4. MINERALIZACIÓN ÓSEA

Se realizaron densitometrías óseas en 26/34 (76%) pacientes con HDC. Se descartó la realización de dicha prueba en 5 de ellos por tener edades inferior a 1 año, 2 rechazaron su participación y otro paciente falleció durante su seguimiento en el protocolo clínico. En la Tabla XVIII se resumen los hallazgos obtenidos en las densitometrías de cada paciente.

Se confirmó disminución de la masa ósea en 11/26 (46%) pacientes con HDC. Se detectó osteopenia (Z-score entre -1 y -2,5) en 5/26 pacientes (#HDC2=-1,42, #HDC8=-1,01, #HDC11=-1,3, #HDC17=-1,4, #HDC21=-1,52). Uno tenía un Z-score en el límite entre osteopenia y osteoporosis (#HDC13=-2,4) y 5/26 padecían osteoporosis con Z-score por debajo de -2,5 DE (#HDC3= -3,07, #HDC7=-3,20, #HDC18=-2,62, #HDC19=-3,21 y #HDC28=-3,3).

HDC	Calcitonina (<11,5 pg/ml)	PTH (12-65 pg/ml)	Fosfata alcalina (<270UI/L)	Vitamina D (ng/ml)	Osteocalcina (3,2-12,2 ng/ml)
#1	9,7	126	154	5	
#2	NSD	35	90	24	13
#3	NSD	53	194	15	23
#4	10,5	17	163	27	30,7
#5	NSD	44		22	10,9
#6	NSD	24	268	16	19
#7	NSD	10		63	12
#8	NSD	33	219	18	44
#9	5,7	7	237	21	11,5
#10	NSD	32	172	21	7,6
#11	NSD	17	202	20	17,3
#12	8,2	14		34	22,3
#13	NSD	44	209	24	9,8
#14	10,1	32	257	30	25,4
#15	NSD	32		21	19,3
#16	NSD	24	339	10	12
#17	NSD	25	230	49	13,6
#18	NSD	38	207	19	
#19	9,5	26	125	23	25
#20	10,6	35	250	27	15
#21	NSD	14	176	18	36
#22	10,4	13	180	51	16
#23	16,9	16	221	32	22,5
#24	NSD	21	263	23	23
#25	NSD	18	182	40	3,2
#26	NSD	28	169	29	0,6
#27	5,4	12	167	28	5,6
#28	NSD	37	290	13	13,8
#29	NSD	15	197	30	
#30	NSD	39	280	26	1,2
#31	NSD	20	297	27	0,2
#32	7	15	213	32	
#33	NSD	100	140	20	19,6
#34	12,8	47	290	35	22,4

Tabla XV. – Resultados de la medición de las hormonas calciotropas participantes en el metabolismo fosfocálcico en los pacientes con HDC.: Calcitonina, PTH_i y vitamina D; y de los parámetros de formación ósea: F.Alcalina y Osteocalcina. En la cabecera de la tabla se muestran los límites de normalidad establecidos por nuestro laboratorio (HU La Paz). Nótese que en la columna relativa a la Osteocalcina se representan entre paréntesis los valores de normalidad para la población adulta, aunque en la población pediátrica se consideran normales valores de hasta 22 ng/ml. Los datos resaltados se corresponden con valores fuera de los límites de normalidad definidos por nuestro laboratorio.

HDC	Edad	Ca _s T (mg/dl)	Ca ²⁺ / _{Cr} _o (mg/mg)*	Fosfato _s (mg/dl)	RTP (%)
#1	16	10,1	0,026	3,6	89,39
#2	15	9,7	0,11	4	87,9
#3	13	9,5	0,07	5,3	91,21
#4	11	9,4	0,23	5,1	83,12
#5	8	9,7	0,021	5,6	94,06
#6	8	10,3	0,08	5,1	
#7	3	10,7	0,35	4,7	
#8	7	9,5	0,1	5,8	93,89
#9	5	10,6	0,23	5,1	88,74
#10	5	9,5	0,15	5,1	82,92
#11	5	9,8	0,1	5	85
#12	4	9,6	0,002		
#13	4	9,4	0,23	5	87,95
#14	3	10,1	0,22	6,1	85,1
#15	3	9,5	0,13	4,9	85,32
#16	3	9,7	0,1	5,3	82,58
#17	2	10,5	0,05	5,4	86,56
#18	3	9,8	0,18	5,3	
#19	4	9,4	0,25	4,5	85,31
#20	3	9,5	0,12	4,5	
#21	3	9,6	0,05	5,2	87,35
#22	2	9,6	0,05	5	81,52
#23	2	9,5	0,11	5	
#24	2	10,1	0,27	5,6	82,61
#25	11m	6,6	0,07	5,6	
#26	18m	10	0,31	4,7	80,1
#27	15m	9,4	0,15	4,6	85,05
#28	18m	9,9	0,29	5,8	82,15
#29	18m	9,5	0,2	4,7	79,02
#30	5m	9,3	0,7	4,9	76,71
#31	10m	9,9	0,3	5,9	
#32	4	9,6	0,18	5,3	80,23
#33	6m	9,6	0,6	4,8	85,92
#34	7m	10,2	0,02	5,7	

Tabla XVI..- Resultados de los principales iones participantes en el metabolismo fosfocálcico: calcio y fósforo, en los pacientes con HDC. (*) Cociente calcio_o/creatinina_o (mg/mg) en orina de micción: parámetro utilizado para la medición de la excreción urinaria de calcio. Se tuvieron en cuenta los valores máximos de referencia en función de la edad de cada paciente (guías K/DOQI) tal y como se explica en el apartado material y métodos del estudio del metabolismo fosfocálcico (tabla xx). Todos los pacientes tenían calciurias <4 mg/kg/24h, consideradas normales. (**) Los valores de referencia de fosfato sérico para cada edad se resumen en la tabla IV (apartado material y métodos). En el grupo de edad > 12 años, se tomaron como referencia los datos por nuestro laboratorio (Tabla III).

RTP: Resorción tubular de fosfato

Control	Calcitonina (<11,5 pg/ml)	PTH (12-65 pg/ml)	Fosfata alcalina (<270UI/L)	Vitamina D (ng/ml)	Osteocalcina (3,2-12,2 ng/ml)
#1	NSD	22	198	56	17,7
#2	NSD	41	155	45	20,4
#3	NSD	59	237	62	42,1
#4	NSD	33	187	20	10,6
#5	10,2	50	133		11
#6	9,8		313	26	
#7	NSD	55	220	18	28,9
#8	10,2	27	279	32	25,6
#9	NSD	20	149	16	29,9
#10	NSD	21	199	23	28,6
#11	NSD	28	268	25	14,2
#12	NSD	36	273	31	21
#13	8,1	20	155	38	11
#14	NSD	6	258	60	17,8
#15	NSD	8	270	59	25,2
#16	9,1	15	175	25	14
#17	NSD	14	222	17	15,2
#18	7,6	53	243	19	
#19	8,8	29	195	32	11
#20	NSD	23	220	40	15,4

Tablas XVII a,b.-Resultados de los principales parámetros del metabolismo fosfocálcico en los niños del grupo Control. a) Valores de las hormonas calciotropas: Calcitonina, PTH, y vitamina D; y de los parámetros de formación ósea: F.Alcalina y Osteocalcina, en el grupo Control. En la cabecera de la tabla se muestran los límites de normalidad establecidos por nuestro laboratorio. Los valores de referencia mostrados en la tabla para la Osteocalcina se refieren a la población adulta. Los límites normales correspondientes en la población pediátrica son <22ng/ml. Los datos resaltados representan valores fuera de los límites de normalidad.

Control	Edad	Ca _s T (mg/dl)	Ca ²⁺ _o /Cr _o (mg/mg)*
#1	16	9,8	0,27
#2	15	10,7	0,42
#3	13	8,9	0,009
#4	11	8,7	0,028
#5	8	9	0,2
#6	2	9,5	
#7	11	9,6	0,09
#8	3	9,5	
#9	9	9,4	0,03
#10	7	9,6	0,15
#11	4	10,2	0,26
#12	3		0,3
#13	3	9,3	0,05
#14	4	10,3	0,145
#15	4	10,4	0,1
#16	3	9,8	0,19
#17	3		0,33
#18	2	9,7	0,29
#19	11m	9,2	0,27
#20	2	9,7	0,2

Tabla XVIIb.- Resultados de los parámetros referentes al calcio sérico y excreción urinaria de calcio en el grupo Control. Todos los participantes de este grupo presentaban valores normales de fósforo sérico y RTP para cada edad.

HDC	Edad (años)	Sexo	Peso		Talla		DMO L ₂ -L ₄ (g/cm ²)	Z-score
			Perc	DE	Perc	DE		
#1	16	V	2	-2,07	2	-2,19	ND	ND
#2	15	M	21	-0,81	17	-0,96	0,97	-1,42
#3	12	V	8	-1,44	12	-1,18	0,558	-3,07
#4	11	V	24	-0,73	90	1,34	0,708	-0,77
#5	8	V	14	-1,1	31	-0,52	0,654	-0,7
#6	8	V	30	-0,54	50	-0,02	0,766	0,7
#7	3	V	<1	-2,47	3	-1,93	0,43	-1,28
#8	7	M	30	-0,53	73	0,63	0,619	-1,01
#9	5	M	42	-0,21	93	1,49	0,752	1,4
#10	5	V	19	-0,91	21	-0,7	0,567	-0,91
#11	5	V	4	-1,87	2	-2,27	0,536	-1,3
#12	4	V	9	-1,38	>99	3,85	0,697	1,1
#13	4	M	3	-2	2	-2,15	0,452	-2,4
#14	3	M	5	-1,68	>99	4,93	0,632	2,05
#15	3	V	17	-0,96	25	-0,7	0,463	-0,81
#16	3	V	61	0,3	98	2,29	ND	ND
#17	2	M	4	-1,82	<1	-5,04	0,412	-1,4
#18	3	M	19	-0,9	20	-0,87	0,445	-2,625
#19	4	V	22	-0,8	36	-0,38	0,395	-3,21
#20	3	V	51	0,05	32	-0,49	ND	ND
#21	3	V	42	-0,21	36	-0,36	0,413	-1,528
#22	2	M	17	-0,96	>99	3,33	0,442	0,29
#23	2	M	3	-1,91	3	-1,95	0,403	-0,61
#24	2	V	23	-0,74	68	0,47	0,45	-0,625
#25	11m	V	<1	-3,01	4	-1,83	ND	ND
#26	18m	V	40	-	25	-	ND	ND
#27	2	V	32	-0,47	38	-0,31	0,449	-0,6375
#28	2	M	12	-	20	-	0,242	-3,3
#29	1	M	19	-0,88	15	-1,05	0,383	-0,28
#30	5 m	M	32	-0,49	51	-0,04	ND	ND
#31	10 m	V	50	0,02	41	-0,24	ND	ND
#32	4	M	25	-0,60	30	-0,53	ND	ND
#33	6m	M	2	-2,31	2	-2,12	ND	ND
#34	7m	V	40	-0,27	50	-0,02	ND	ND

Tabla XVIII.- Resultados del estudio de mineralización ósea en los pacientes del grupo HDC. En cada caso se ofrecen los datos de peso (Percentil y Desviación Estándar), talla, DMO a nivel L₂-L₄ expresados en g/cm² y Z-score correspondiente. Las celdas resaltadas representan cifras de osteopenia u osteoporosis. ND: no disponible

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TIROIDES EN AUTOPSIAS DE PACIENTES CON HDC

El tamaño de las muestras tiroideas examinadas en los pacientes con HDC y en los controles fue similar con una superficie tiroidea total uniforme en ambos grupos (CDH= $73,99 \pm 22,69 \text{ mm}^2$, Controles= $70,56 \pm 22,96 \text{ mm}^2$, *n.s.*).

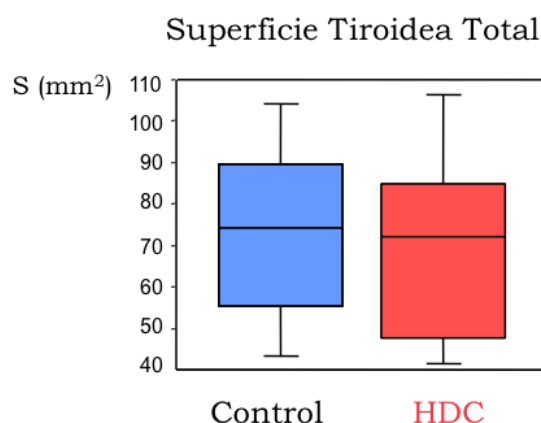


Figura 37: Diagramas de cajas que muestra las superficies (mm^2) de las preparaciones tiroideas de ambos grupos de estudio. Como puede observarse, las muestras pueden considerarse homogéneas, con tamaños que no demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Las CC mostraban una disposición normal, con acúmulo de las mismas en las regiones centrales de ambos lóbulos tiroideos y escasez en las zonas periféricas de los mismos; según la distribución teórica descrita en el humano^{248, 254} (Figuras 39 y 40).

Se demostró una menor tinción de los tiroides pertenecientes a los pacientes con HDC, que se expresó como una disminución significativa del porcentaje de la superficie inmunohistoquímicamente teñida con anticalcitonina en relación a la superficie tiroidea total en estos niños en comparación con el grupo control ($0,035 \pm 0,030\%$ vs $0,072 \pm 0,052\%$, $p < 0,05$).

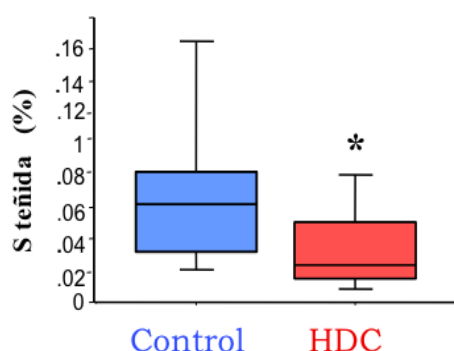


Figura 38: Diagrama de cajas que representa la proporción de superficie tiroidea teñida con anticalcitonina en ambos grupos. Se demuestra una menor tinción en los tiroides de los pacientes con HDC.

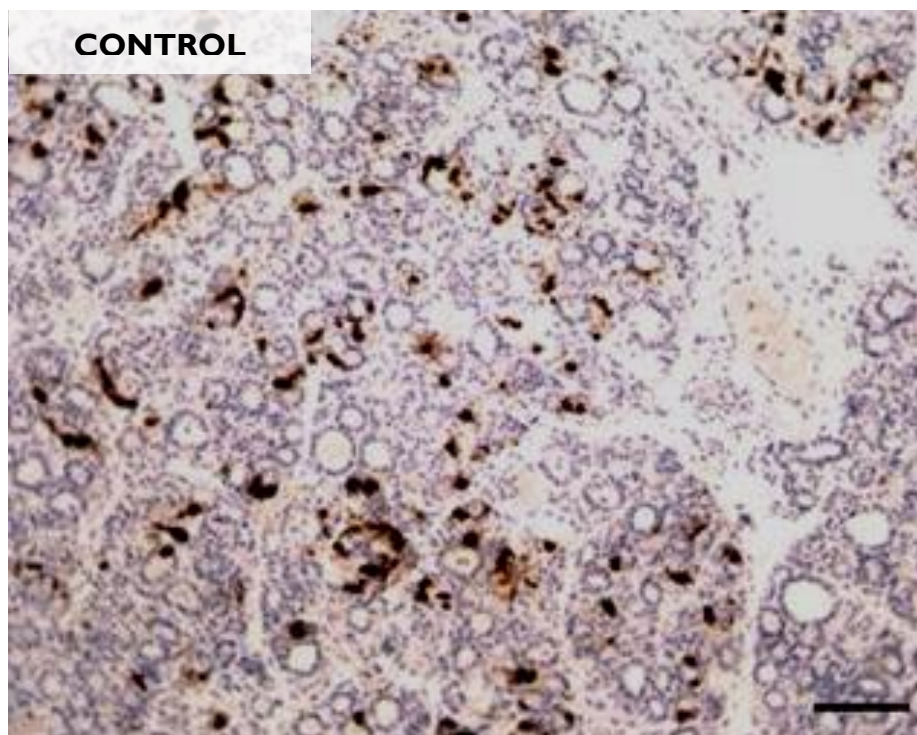


Figura 39.- Sección de parénquima tiroideo perteneciente a un RN del grupo control. Tinción inmunohistoquímica con Anticuerpo anticalcitonina que tiñe las células C productoras de calcitonina. La imagen se tomó de la zona central de uno de los lóbulos tiroideos, donde se localiza la mayor cantidad de CC, y por lo tanto, hay mayor densidad de tinción. Magnificación: 20x.

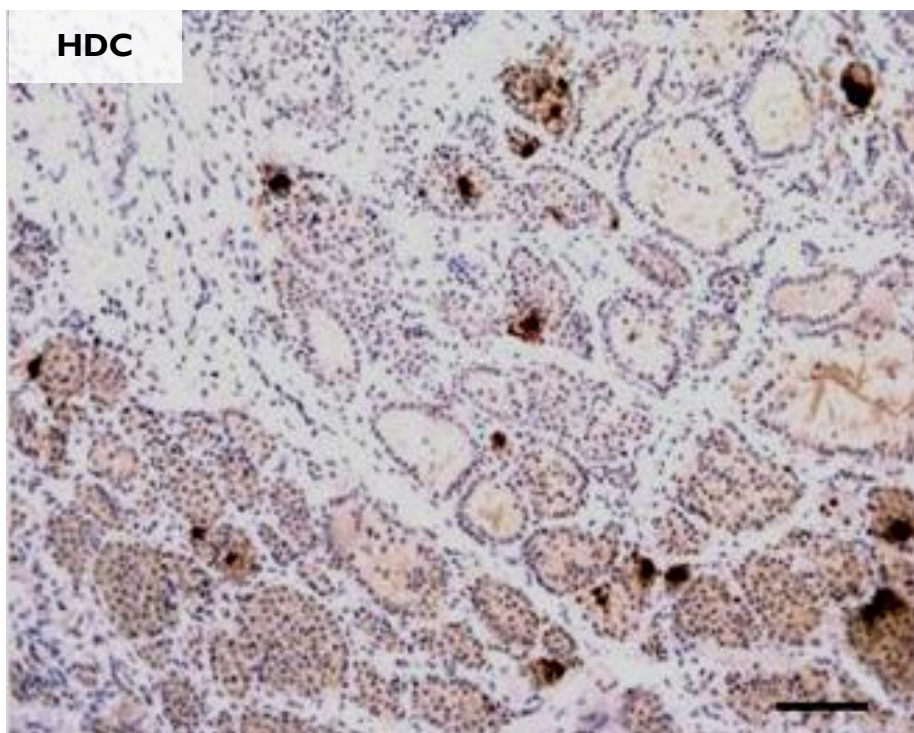


Figura 40.- Sección de parénquima tiroideo perteneciente a un RN del grupo HDC. Tinción inmunohistoquímica con Anticuerpo anticalcitonina. Se observa una importante disminución de áreas teñidas en comparación al la Figura 37 (Control). Escala: 100 μ m. Magnificación 20x.

3. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS. MALFORACIONES CERVICOTORACICAS.

3.1. ANIMALES DE ESTUDIO. GLÁNDULA TÍMICA:

Se obtuvieron 162 fetos, producto de las gestaciones de las 14 ratas gestantes incluidas en el estudio: 9 tratadas con nitrofen, y 5 del grupo Control a las que se administró placebo. Se obtuvieron un total de 99 fetos de las madres tratadas con nitrofen y 63 de las del grupo Control. De los fetos del grupo tratado, 68 (68,6%) tenían HDC. Estos fetos con HDC eran más pequeños que los del grupo control, con pesos significativamente menores (peso medio: $4,5 \pm 0,26$ g vs $5,3 \pm 0,2$ g, respectivamente; $p < 0,05$). Se eligieron de forma aleatoria y provenientes de todas las madres gestantes, 19 fetos con HDC y 11 del grupo Control para su estudio anatómico posterior.

En los animales del grupo control no se identificaron malformaciones en ninguno de los órganos estudiados y su anatomía cervicotorácica, cardiovascular y abdominal presentaba una disposición normal equivalente a la teórica descrita en los atlas de anatomía de la especie murina^{298, 299, 372-374}.

La localización del defecto diafragmático en los fetos con HDC fué izquierda en 10, derecha en 7 y bilateral en 2. En las HDC derechas el contenido herniario lo formaba el lóbulo hepático derecho y en las de localización izquierda el lóbulo hepático izquierdo y el estómago. En las HDC izquierdas el orificio diafragmático midió un tamaño medio de: $6,45 \pm 1,31$ mm (T) x $5,44 \pm 1,03$ mm (S) y en las de localización derecha: $6,73 \pm 0,62$ mm (T) x $4,16 \pm 0,86$ mm (S). En las HDC bilaterales, sólo se observó un mínimo rodete diafragmático anterior. En ningún caso se identificó saco herniario.

En los fetos con HDC, el timo era menos globuloso y homogéneo que en los controles, con áreas centrales de señal grasa, más evidentes en las proyecciones axiales. Las dimensiones tímicas medias en el grupo HDC fueron: $2,91 \times 1,1 \times 2,5$ mm (LxAPxT) y $4 \times 1,3 \times 2,8$ mm en el grupo Control, confirmándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), más acentuadas en el plano longitudinal (Figura 41).

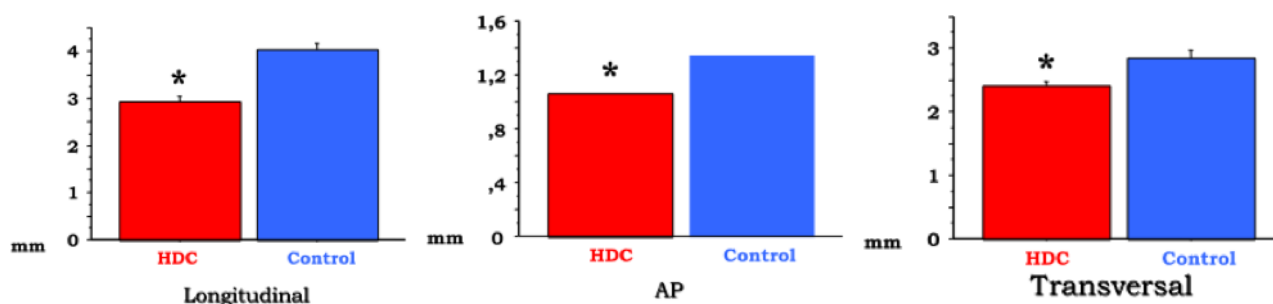


Figura 41.- Gráficos que muestran las dimensiones del timo en los distintos planos espaciales: longitudinal, anteroposterior (AP) y transversal. Se demuestra un menor tamaño tímico, con diferencias estadísticamente significativas en todos los planos (*= $p < 0,01$) en los pacientes con HDC.

3.2. SISTEMA RESPIRATORIO:

Árbol Traqueobronquial: En 6/19 fetos con HDC se detectaron anillos traqueales irregulares y en 4/19 dilataciones segmentarias en los bronquios principales. Dos fetos con HDC derecha mostraban dilatación del bronquio principal derecho, 1 con HDC izquierda presentaba dilatación del bronquio principal izquierdo y en un caso de HDC bilateral se demostró dilatación bronquial bilateral.

Pulmones: en 13/19 animales con HDC (5 derechas y 8 izquierdas) el parénquima pulmonar del lado del defecto diafragmático se presentaba más compacto, poco aireado y de menor tamaño, traduciendo hipoplasia pulmonar ipsilateral, más acentuada en los lóbulos pulmonares superiores. En 4/19 (2 D y 2 I), estos cambios hipoplásicos eran claramente bilaterales. En uno de los casos bilaterales se diagnosticó hipoplasia pulmonar bilateral y en el otro izquierda. En las hernias diafragmáticas izquierdas, se observó hipoplasia o incluso ausencia del lóbulo pulmonar retrocardíaco, mientras que en las de localización derecha, éste tenía una apariencia normal. En ningún animal del grupo control se encontraron alteraciones pulmonares.

3.3. APARATO CARDIOVASCULAR:

La RM permitió el estudio detallado y de alta resolución con reconstrucciones multiplanares de las cuatro cámaras cardíacas, y de sus polos arterial (derivado de los arcos aórticos) y venoso. Se diagnosticaron 27 malformaciones cardiovasculares en 15 de los 19 fetos con HDC (78%), que quedan resumidas en la Tabla XIX.

3.3.1. GRANDES VASOS ARTERIALES:

La afectación del arco aórtico en forma de Arco Aórtico Derecho (6), Ductus Arterioso Persistente Derecho (1), Arteria Subclavia Derecha Aberrante (4) y Coartación de Aorta (1), junto a los defectos septales ventriculares (5), fueron las más frecuentes. Además se diagnosticaron 4 anillos vasculares completos formados en tres ocasiones por la combinación de Arco Aórtico Derecho y Ductus Arterioso Izquierdo, y en otra por la existencia de un Ductus Arterioso Derecho en un feto con un arco aórtico izquierdo. En tres de los animales en los que se diagnosticó una Arteria Subclavia derecha Aberrante, ésta coexistía con un arco aórtico derecho contribuyendo al anillo vascular, con importante compresión traqueal y esofágica. Y en el otro caso aparecía en un feto con un arco aórtico izquierdo, formando un anillo vascular incompleto. En 3 casos se confirmó la existencia de divertículo de Kommerell.

Otros diagnósticos malformativos cardiovasculares fueron: Tetralogía de Fallot (3) e Hipoplasia de Arteria Pulmonar (2). En el estado embrionario en el que se examinaron los fetos (E21), el Ductus Arterioso era patente en 18/19 animales con HDC y en 8/11 controles, con un diámetro transversal medio de $0,28 \pm 0,20$ mm y $0,35 \pm 0,21$ mm, respectivamente.

Arco Aórtico Derecho	6
Defectos septales ventriculares (CIV)	5
Anillos vasculares complejos	4
Arteria Subclavia Derecha Aberrante	4
Tetralogía de Fallot	3
Hipoplasia Arteria Pulmonar	2
Coartación de Aorta	1
Ventana aorto-pulmonar	1
Ductus arterioso derecho	1

Tabla XIX.- Resumen de las malformaciones cardiovasculares diagnosticadas en los fetos con HDC (15/19:78%). Dichas malformaciones se enumeran por orden de frecuencia de aparición.

3.3.2. CORAZÓN:

Los diámetros medios de la AD fueron de $1,31 \pm 0,25 \text{mm}$ (AP) \times $2,05 \pm 0,52 \text{mm}$ (T) en los animales con HDC y de $1,59 \pm 0,18 \text{mm}$ (AP) \times $2,58 \pm 0,25 \text{mm}$ (T) en los controles; y los de la AI: $0,69 \pm 0,12 \text{mm}$ (AP) \times $1,45 \pm 0,28 \text{mm}$ (T) y $0,96 \pm 0,14 \text{mm}$ (AP) \times $2,06 \pm 0,40 \text{mm}$ (T) en animales con HDC y controles, respectivamente.

En los fetos con HDC la pared del VD tenía un espesor de $0,40 \pm 0,10 \text{mm}$, la del VI $0,50 \pm 0,09 \text{mm}$ y el septo interventricular (SIV) $0,70 \pm 0,12 \text{mm}$. En los controles estas medidas eran $0,28 \pm 0,09 \text{mm}$ (VD), $0,46 \pm 0,15 \text{mm}$ (VI) y $0,75 \pm 0,21 \text{mm}$ (SIV).

En el estudio estadístico analítico se demostraron diámetros significativamente menores de ambas aurículas (diámetros AP y T en la AI y diámetros transversales en la AD) en los animales con HDC ($p < 0,05$). El ventrículo derecho era significativamente mayor en los fetos con HDC ($p < 0,05$). El VI y el SIV eran similares en ambos grupos (Tablas XX-XXII).

En 4/19 casos con HDC se detectó hipertrofia ventricular y en 3/19 (1 HDC de localización derecha y 2 izquierda) hipoplasia cardíaca.

No se observaron defectos septales auriculares ni alteraciones a nivel de las válvulas aurículoventriculares en los fetos con HDC. No se diagnosticó ninguna malformación cardiovascular entre los animales del grupo control.

En la Tabla XXIII se enumeran las malformaciones cardiovasculares, referidas al corazón y los grandes vasos arteriales, diagnosticadas en cada feto con HDC. Las anomalías venosas se tratan en otro apartado.

Diámetro (mm)	HDC		CONTROL	
	AP	T	AP	T
AD	1,31 ± 0,25	2,05 ± 0,52	1,59 ± 0,18	2,58 ± 0,25
AI	0,69 ± 0,12	1,45 ± 0,28	0,96 ± 0,14	2,06 ± 0,40

Tabla XX. -Dimensiones de los diámetros auriculares en los grupos HDC y Control. Valores en medias y DE.

ESPESOR (mm)	HDC	CONTROL
VD	0,4 ± 0,10	0,28 ± 0,09
VI	0,50 ± 0,09	0,46 ± 0,15
SIV	0,70 ± 0,12	0,75 ± 0,21

Tabla XXI. Valores del grosor de las paredes ventriculares y del septo interventricular (SIV). Valores en medias y DE.

	HDC	CONTROL	p
AD			
AP	1,31 ± 0,25	1,59 ± 0,18	0,14
T*	2,05 ± 0,52	2,58 ± 0,25	0,06
AI			
AP*	0,69 ± 0,12	0,96 ± 0,14	0,0037
T*	1,45 ± 0,28	2,06 ± 0,40	0,0077
ESPESOR			
VD*	0,40 ± 0,10	0,28 ± 0,09	0,01
VI	0,50 ± 0,09	0,46 ± 0,15	0,07
SIV	0,70 ± 0,12	0,75 ± 0,21	0,61

Tabla XXII. Comparación de los diámetros cardíacos entre los fetos con HDC y los controles.

Paciente	LADO	CIV	TF	Arco Ao	DAP	NOPT	ASA	Hipertrofia cardíaca	Hipoplasia Pulmonar	Hipoplasia I. retrocardíaco	OTROS
#1	I	----	----	I	I	NO	NO	NO	I	SI	----
#2	D	----	----	D	I	NO	NO	NO	D	NO	Dilatación bronquio D
#3	I	----	----	I	I	NO	NO	SI	I	SI	----
#4	I	----	----	I	I	NO	NO	NO	I	SI	Hipoplasia cardíaca
#5	I	SI	----	I	I	SI	NO	NO	I	SI	Hipoplasia AP/ Ao Hipoplasia cardíaca
#6	I	----	----	D	I	NO	SI	NO	I	SI	----
#7	I	SI	----	D	I	SI	NO		I	SI	----
#8	D	----	----	I	I	SI	NO	NO	D	NO	----
#9	B	----	----	I	I	NO	SI	NO	I	SI	Dilatación bronquio (D/I) Acodadura API
#10	I	SI	SI	D	NO	SI	NO	NO	B	SI	---
#11	D	SI	----	I	I	SI	NO	SI	B	NO	---
#12	I	----	----	I	I	NO	NO	NO	I	SI	----
#13	I	SI	----	D	I	NO	SI	NO	B	SI	----
#14	D	SI	SI	I	I	SI	NO	SI	D	NO	----
#15	I	----	----	I	I	NO	NO	NO	I	SI	Dilatación bronquio I
#16	D	----	----	I	I	NO	NO	NO	B	SI	----
#17	D	----	----	D	I	NO	SI	NO	D	NO	----
#18	D	SI	SI	D	I	SI	NO	SI	D	NO	Hipoplasia cardíaca Dilatación bronquio D
#19	B	SI	----	I	D	SI	NO	NO	B	SI	Coartación Aorta

Tabla XXIII.- Resumen de las malformaciones cardiovasculares detectadas mediante RM en cada feto con HDC. **I:** izquierda; **D:** derecha; **B:** bilateral. **CIV:** comunicación interventricular. **TF:** Tetralogía de Fallot; **Arco Ao:** Arco Aórtico; **DAP:** Ductus arterioso persistente; **NOPT:** estenosis del tracto de salida pulmonar (“*narrow outflow pulmonary tract*”); **ASA:** Arteria subclavia aberrante. **AP:** Arteria pulmonar. **API:** Arteria pulmonar izquierda.

3.3.3.- SISTEMA VENOSO SISTEMICO CERVICOTORÁCICO

Los estudios con RM permitieron identificar las principales venas sistémicas de las regiones cervical y torácica. así como el trayecto de la VCI en la cavidad abdominal, tanto en los Controles como en los fetos con HDC.

Las venas sistémicas seguían el patrón anatómico teórico descrito en la especie murina^{299, 373} en ambos grupos. Se comprobó el mayor tamaño de las Venas Yugulares Externas con respecto a las Internas, formadas a partir de las Venas Facial Anterior y Posterior. Se distinguía bien su unión a las venas axilares para formar las Venas Subclavias. Así mismo, se identificaba la unión de las Venas Yugulares Internas a las Venas Subclavias correspondientes en cada lado, para formar las Venas Cavas Superiores derecha e izquierda. Los mínimos diámetros transversales de estas Venas Yugulares Internas impidieron su medición exacta en 7/19 fetos con HDC y en 3/11 del grupo Control.

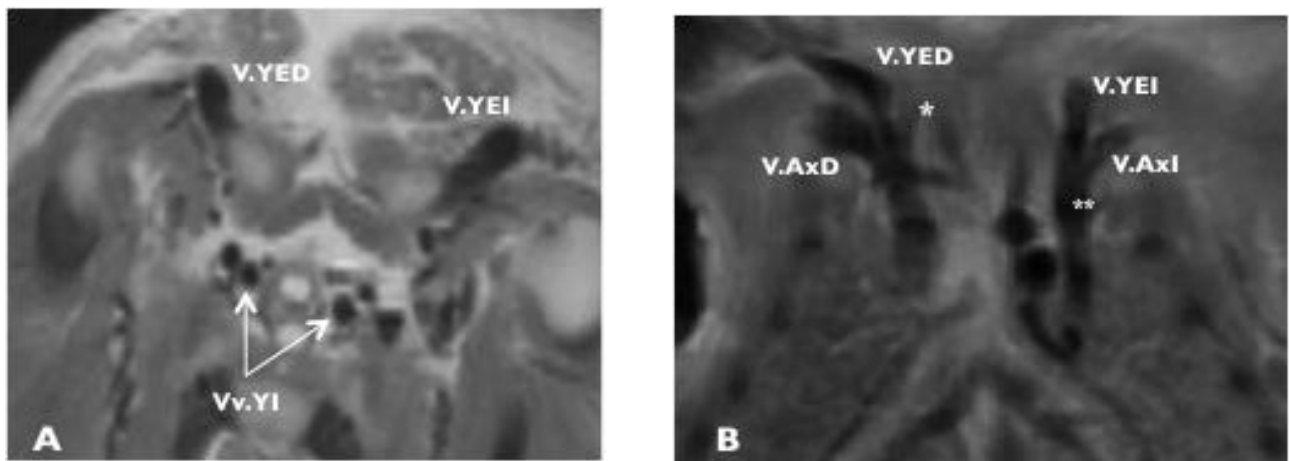


Figura 42.-RM de un feto del grupo Control. Cortes axiales. **A:** Se demuestra el mayor calibre de las VYugulares Externas con respecto a las VYugulares internas.. En la Figura **B** se observa la confluencia de las V Yugulares Externas con las Vv Axilares para formar las V Subclavias en ambos lados (*:*)

En todos los fetos, tanto en los del grupo HDC como en los controles, se identificaron las dos Venas Cavas Superiores, derecha e izquierda (derivada ésta última de la vena cardinal anterior izquierda, que a diferencia de los humanos, no regresa en la especie murina), que drenaban los territorios de la cabeza, cuello y miembro superior de cada lado corporal en la aurícula derecha, a través del seno venoso en el lado izquierdo.

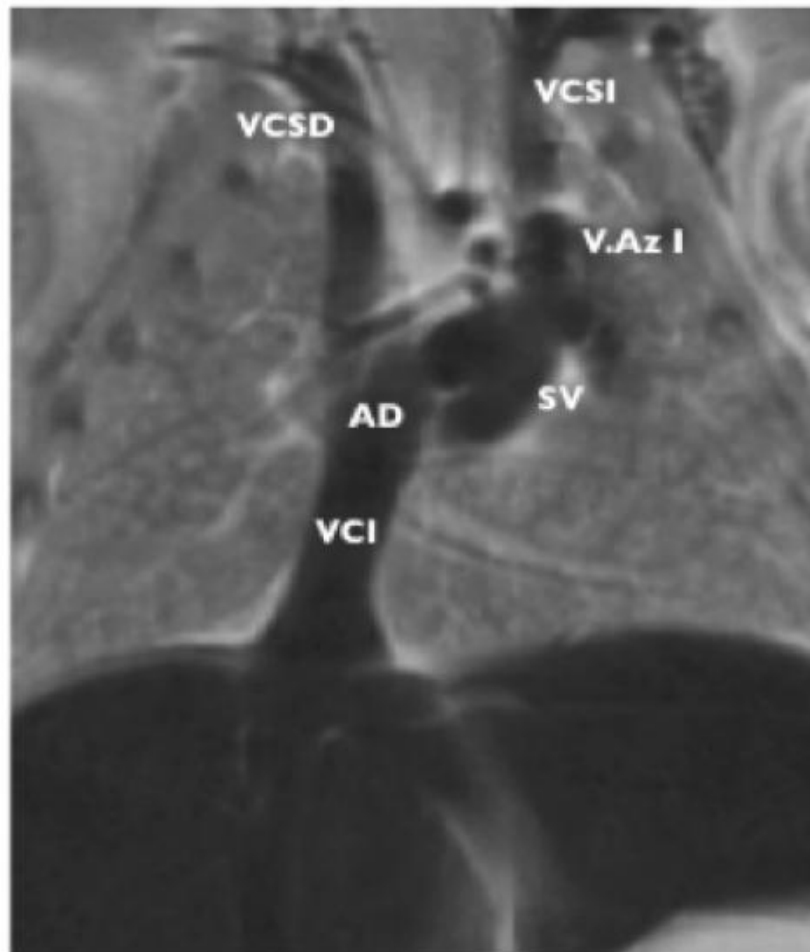


Figura 43.- RM en un feto del grupo Control en el que se muestran las principales venas sistémicas de la región torácica. Se observa la presencia de dos Vv. Cava Superiores simétricas, que en el lado izquierdo drena a la aurícula derecha (AD) a través del seno venoso (SV). La Vena Acigos Izquierda (V.AzI) se une a la VCSI para desembocar ambas en la aurícula derecha. VCSD: V.Cava Superior Derecha. VCSI: V.Cava Superior Izquierda. VCI: V.Cava Inferior.

Se confirmó también que la vena Acigos discurría a la izquierda de la columna vertebral y desembocaba en la Cava Superior Izquierda, para drenar ambas en la aurícula derecha a través del seno venoso.

Debido al mínimo calibre de la vena Acigos derecha (Vena Hemiácigos), ésta se identificó sólo en 7/19 fetos con HDC y en 4/11 Controles, siendo menor la diferencia de calibre entre ambos lados en los controles que en el grupo HDC. La vena Acigos derecha cuando existía drenaba en la VCSD.

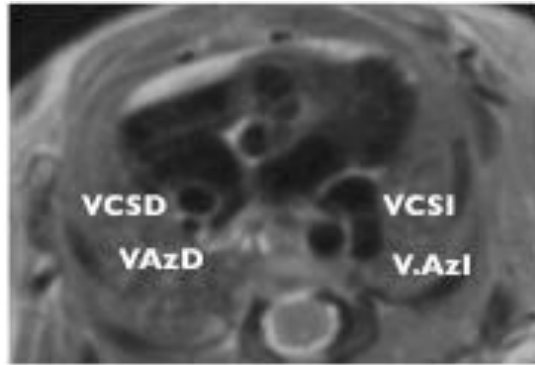


Figura 44.- Corte axial de RM de un feto con HDC izquierda en el que se puede observar el mayor calibre de la V.Acigos Izquierda con respecto a la del lado derecho. Ambas desembocan en la V.Cava Superior ipsilateral, para su drenaje en la aurícula derecha; a través del seno venoso en el caso de la V.Cava Superior Izquierda.

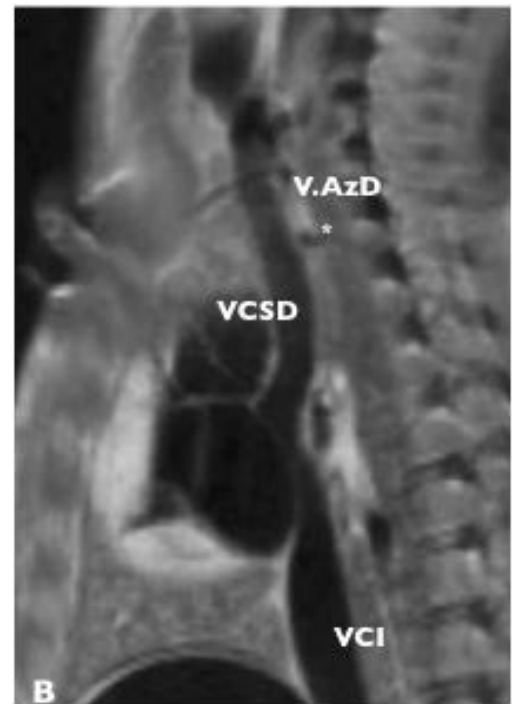
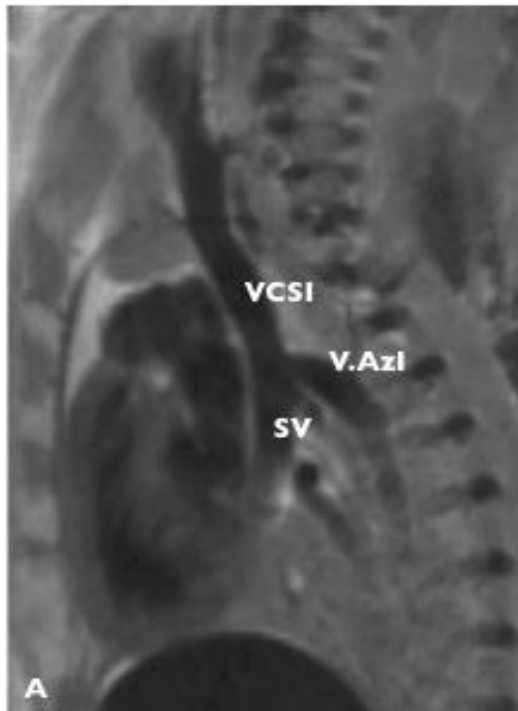


Figura 45.- Imágenes de RM en feto Control obtenidas en cortes sagitales. Se observa la desembocadura de las Vv Acigos en las Vv Cavas Superiores ipsilaterales ; y el mayor calibre de la V. Acigos del lado izquierdo.

Los valores resultantes de la medición de las venas sistémicas según su diámetro transversal (T) y relacionados con la medida T3-T5 en cada caso, se calcularon en medias y DE y se exponen en la Tabla XXIV.

Según estos resultados, se pudo demostrar que las venas sistémicas del territorio cervicotorácico de los fetos con HDC eran de menor tamaño en su diámetro transversal que las correspondientes de los fetos del grupo Control. Dichas diferencias fueron mayores en el caso de la Vena Yugular Externa izquierda, las Venas Braquiocefálicas, la Vena Cava Superior derecha y la Vena Acigos izquierda, en las que los valores de comparación demostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). La disminución en el tamaño de estas venas no guardaba relación con la localización del defecto diafragmático.

	Control (n= 11)	HDC (n= 19)
V. Yugular externa derecha	$0,26 \pm 0,12$	$0,20 \pm 0,75$
V. Yugular externa izquierda	$0,24 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,78^*$
V. Yugular interna derecha	$0,08 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,23$
V. Yugular interna izquierda	$0,093 \pm 0,1$	$0,098 \pm 0,03$
V. Innominada derecha	$0,28 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,57^*$
V. Innominada izquierda	$0,26 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,63^*$
V. Cava superior derecha	$0,32 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,70^*$
V. Cava superior izquierda	$0,31 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,93$
V. Acigos (I)	$0,19 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,04^*$

Tabla XXIV. -Dimensiones (mm) de las venas del territorio cervicotorácico en fetos con HDC y Controles. Valores según el plano transversal (medias \pm DE). Los diámetros absolutos se corrigieron en relación a la longitud T3-T5 en ambos grupos. $^* = p < 0,05$

Las Figuras 46 y 47 muestran algunas imágenes de RM en fetos con HDC que demuestran anomalías venosas en el territorio cervicotorácico.

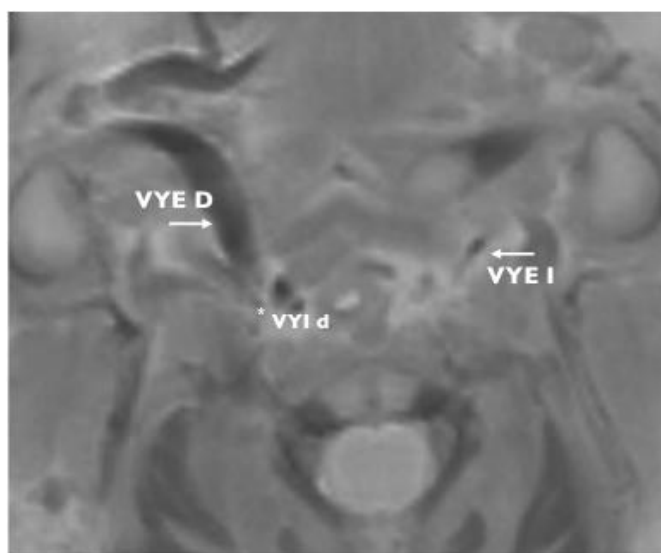


Figura 46.- Imagen de RM de un feto con HDC derecha en una sección coronal. Se observa la asimetría en el calibre de ambas Yugulares Externas, con hipoplasia izquierda. Nótase el menor tamaño de la VYID con respecto a la VYED, tal y como se dispone normalmente en la especie murina. VYE D: V:Yugular Externa Derecha. VYE I: Vena Yugular Externa Izquierda. VYI d: Vena Yugular Interna derecha.

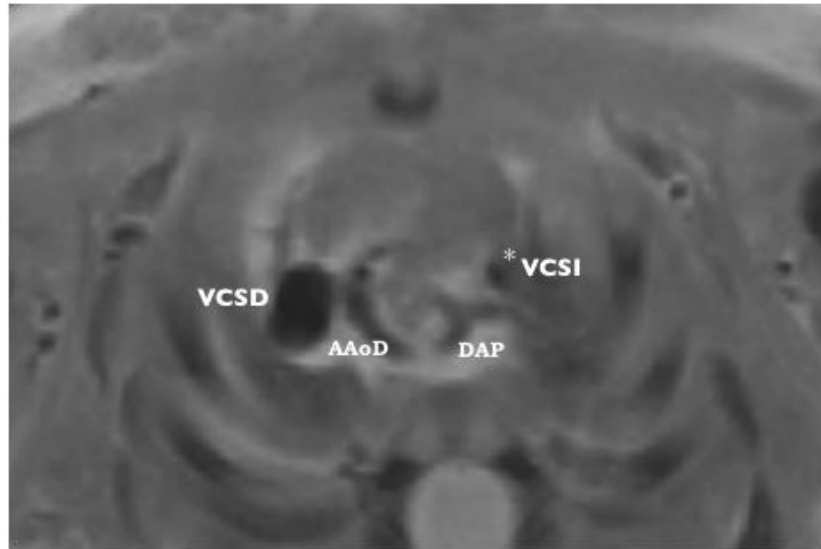


Figura 47.- Corte axial de RM obtenida en feto con HDC izquierda. Se demuestra la diferencia de tamaño entre ambas Vv. Cavas Superiores. En dicho feto se diagnosticó además la existencia de un arco aórtico derecho (AAoD) y ductus arterioso persistente (DAP), que formaban un anillo vascular completo alrededor de la tráquea y el esófago.

3.3.4. VENA CAVA INFERIOR:

Se observó una diferencia muy marcada en el calibre de la vena cava inferior abdominal a nivel infrahepático en ambos grupos, siendo aproximadamente 1/3 menor en la región inferior a la confluencia de las vv suprahepáticas en comparación con la zona superior de la desembocadura de las vv suprahepáticas. En todos los animales, la VCI presentaba una disposición lateral característica en su unión con las Venas Suprahepáticas, a modo de drenaje latero-terminal.

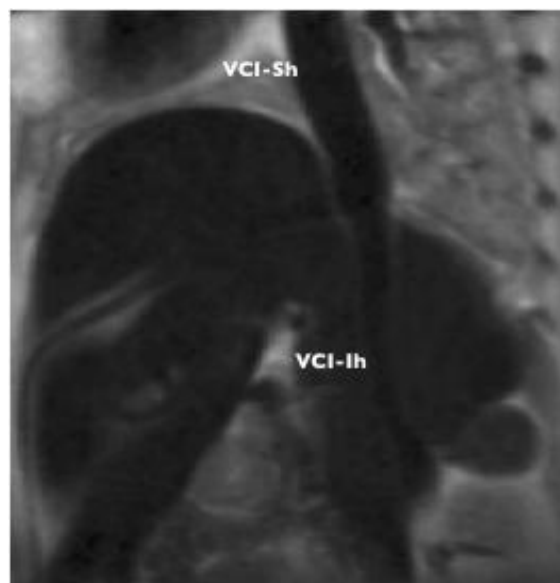


Figura 48.- Imagen de RM de un feto Control de la región abdominal. Sección sagital. Se muestra la disposición de la V.Cava Inferior a nivel suprahepático distal a la desembocadura de las Venas Suprahepáticas) e intrahepático. Obsérvese el menor calibre de la VCI infrahepática

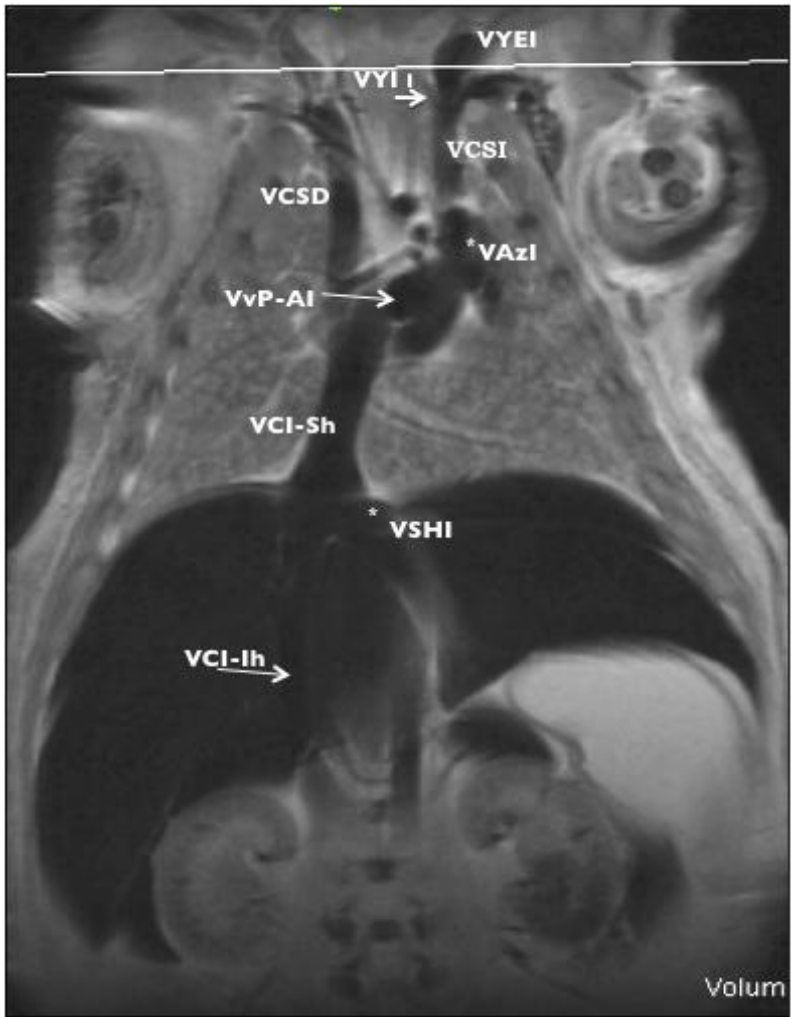


Figura 49 - Imagen en el plano sagital de un feto del grupo Control en el que se muestra la anatomía normal de esta especie animal. Es patente el menor tamaño de la V.Cava Inferior a nivel infrahepático (VCI-Ih); así como la unión latero-terminal entre la VCI y la V.Suprahepática Izquierda (VSHI). VCI-Sh: V.Cava Inferior Suprahepática (distal) a la confluencia de las Vv. Suprahepáticas. VvP-Al: Venas Pulmonares en la entrada en la aurícula izquierda. VCSd: V.Cava Superior Derecha. *V.Azl: V.Acigos Izquierda. VCSi: V.Cava Superior Izquierda. VYli: V.Yugular Interna izquierda. VYEl: V.Yugular Externa Izquierda.

Según la localización de la HDC, la VCI mostraba variaciones en su disposición y trayecto. Así, en las HDC derechas, la Vena Cava Inferior aparecía acodada “en cayado de pastor” en las proyecciones sagitales, en la región inferior (proximal) a la confluencia de las venas suprahepáticas acompañando a la herniación del hígado; mientras que la región suprahepática seguía un trayecto normal, sin herniación de esta zona más proximal.

En las hernias izquierdas, se apreciaba un desplazamiento global de todo el mediastino a la derecha, con incurvación lateral derecha de la VCI, sin observarse alteraciones de su calibre. En los dos casos de HDC bilateral, la VCI presentaba una disposición anatómica normal, comparable a la visualizada en los controles.



Figura 50.- Imágenes de RM en sección sagital que muestran la disposición de la V. Cava Inferior en los fetos con HDC. **A.-** Feto con HDC derecha, en la que se observa la porción infrahepática (VCI-Ih) elevada y angulada, y la porción suprahepática (VCI-Sh) con una disposición anatómica normal. La flecha gruesa muestra la unión entre estas dos regiones de la VCI. Las tres flechas finas representan el borde diafragmático derecho, que cuando desaparece produce la herniación hepática; y el asterístico (*): el lóbulo retro-cava disminuido de tamaño. La figura **B** se corresponde con una HDC izquierda, en la que se observa la hipoplasia de la VCI, con una disposición normal en todo su recorrido.

A nivel torácico, la VCI discurriría entre el parénquima pulmonar en los animales del grupo Control, trayecto no visible en los casos de HDC derecha, en los que ésta tenía un recorrido exclusivamente hepático.

Los diámetros transversales de la VCI en la porción suprahepática fueron de $0,97 \pm 0,23$ mm en los fetos con HDC vs $1,09 \pm 0,19$ mm en los Controles en HDC (n.s.). A nivel infrahepático, la VCI en su eje anteroposterior demostró ser significativamente mayor en los fetos del grupo control: $0,41 \pm 0,09$ mm vs $0,3 \pm 0,12$ mm ($p = 0,01$).

3.3.5. VENAS PULMONARES:

Se observó que el flujo pulmonar drenaba a partir de tres venas pulmonares principales: Vena Pulmonar Superior (derecha e izquierda) y una Vena Pulmonar Inferior, con trayecto vertical procedente de ambos lóbulos inferiores y del lóbulo retro-cava, que conectaba finalmente con la vena pulmonar superior izquierda. Estas tres venas confluían a modo de “tridente” y a través de un colector común, drenaban en la aurícula izquierda, con un trayecto anterior a la VCSI.

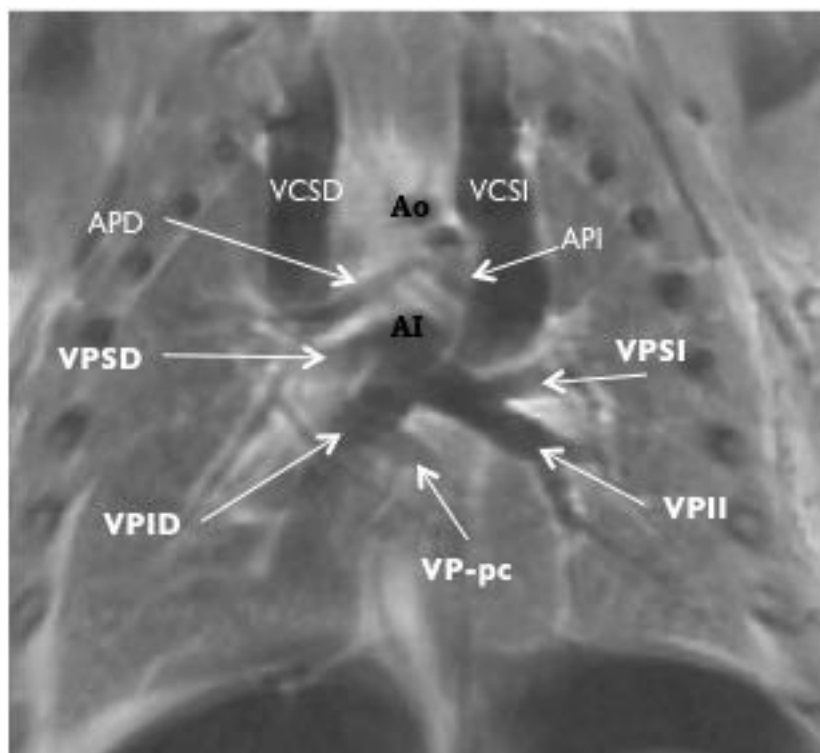


Figura 51.- Disposición anatómica normal de las Venas Pulmonares en la rata. De forma característica, las Vv Pulmonares se disponen en forma de “tridente” para desembocar en un colector único en el infundíbulo de la aurícula izquierda (AI). VPID: V.Pulmonar Inferior Derecha. VP-pc: V.Pulmonar del lóbulo retro-cava. VPII: V.Pulmonar Inferior Izquierda. VPSI: V.Pulmonar Superior Izquierda. VPSD: V.Pulmonar Superior Derecha. APD: Arteria Pulmonar Derecha. API: Arteria Pulmonar Izquierda. VCS: V. Cava Superior Derecha. VCSI: V.Cava Superior Izquierda. Ao: Aorta.

En 6/19 fetos con hernia diafrágica (5 HDC derecha y 1 HDC izquierda), se observó una variación en este patrón de drenaje pulmonar, en el que la vena de drenaje del lóbulo pulmonar superior derecho aparecía desplazada con respecto al inferior común. Según esta distribución, se confirmó la existencia de dos venas derechas (anterior y posterior) y una vena izquierda.

El diámetro medio transversal del colector pulmonar fue significativamente menor en los fetos con HDC ($0,4 \pm 0,1 \text{ mm}$ vs $0,56 \pm 0,18 \text{ mm}$, $p < 0,05$). En ningún caso se diagnosticó drenaje pulmonar anómalo.

DISCUSION

Este trabajo supone una nueva evidencia de que el amplio espectro de malformaciones craneofaciales, cardíacas y de los órganos cervicales derivados de las bolsas faríngeas (glándulas paratiroides, timo y porción parafolicular del tiroides) que acompañan a la HDC, tiene un origen neurocristal común. Dicho espectro es idéntico o muy parecido al que existe en otras enfermedades en las que existe un fallo embriogénico de la CN, como la Atresia de Esófago, las cardiopatías troncoconales o el síndrome de Di George. Nuestros hallazgos, unidos al descubrimiento más reciente de alteraciones en otras estructuras neurocristales como la innervación vagal entérica o del árbol traqueobronquial, sustentan la hipótesis del importante papel de la CN tanto en la génesis de la propia HDC como de sus malformaciones asociadas^{80,81,131,160,161,375}.

El modelo experimental de HDC inducida con nitrofen ofrece la posibilidad de reproducir en ratas en condiciones controladas de laboratorio, la misma enfermedad del humano. No sólo en cuanto a la presencia de orificio diafragmático e hipoplasia pulmonar, sino también en lo que respecta a muchas malformaciones que componen el espectro malformativo de la HDC.

Sin embargo y a pesar de este paralelismo, algunas alteraciones descritas en los roedores no están presentes o al menos no habían sido demostradas en el humano. Esto ocurre, por ejemplo, con la disminución de células C tiroideas o las anomalías del timo y las glándulas paratiroides. La dificultad de este estudio por razones de disponibilidad de material o por el carácter subclínico de sus consecuencias, nos ha animado a su investigación a través de un diseño clínico doble: un estudio caso-control en pacientes supervivientes y una valoración histológica tiroidea en autopsias de niños fallecidos con HDC.

En este sentido este trabajo demuestra la existencia de alteraciones evidentes en la distribución de las células C tiroideas en el material necrópsico. Sin embargo, el estudio clínico en supervivientes no ha podido confirmar claras anomalías, pues las variaciones en las poblaciones linfocitarias o en el metabolismo fosfocálcico difieren poco entre los pacientes con HDC y los pertenecientes al grupo control. Ocurre lo mismo con las variaciones de la masa ósea detectadas en determinados pacientes con HDC, que hay que interpretar individualizadamente por asociarse en muchos de ellos a antecedentes clínicos que pueden justificarlos.

A pesar de esta falta de hallazgos, el diseño del estudio nos ha permitido identificar a una proporción no desdeñable de pacientes con osteoporosis o en riesgo de padecerla y a otros en situación de desnutrición, así como una mayoría con niveles deficitarios de vitamina D. Todo ello ha repercutido en un mejor control y en la protocolización del seguimiento de los pacientes supervivientes con HDC.

La segunda parte del trabajo, el diseño experimental en animales de laboratorio, describe de una manera muy gráfica numerosas malformaciones venosas derivadas de una posible organogénesis anormal de la CN. La técnica usada (la Micro-Resonancia Magnética), además, se ha mostrado como un método no invasivo, reproducible y fiable del resto de malformaciones cardiovasculares y pulmonares asociadas al defecto diafragmático.

A continuación describimos los hallazgos del trabajo a la luz de la literatura existente.

I. ESTUDIO CLÍNICO:

La primera revisión o visita del paciente a la Consulta Externa ha permitido conocer las características epidemiológicas y clínicas, así como las complicaciones de nuestros pacientes con HDC durante el período de estudio, que han sido las esperables y coincidentes con lo que se observa en la práctica clínica diaria y con lo publicado a este respecto ^{125, 126, 129, 376, 377}.

De esta evaluación ha resultado un estudio descriptivo de nuestra población con HDC, que aunque no era uno de los objetivos de este trabajo, ha sido crucial para situar en el tiempo a cada paciente en el protocolo clínico (anexo III) y por otra parte, ha desvelado datos importantes necesarios para valorar y contextualizar los resultados obtenidos en los estudios de cuantificación linfocitaria, de la homeostasis fosfocálcica, y en la interpretación de los resultados de las densitometrías óseas, como se verá en cada apartado.

No obstante, la naturaleza descriptiva y retrospectiva de esta valoración, con una muestra que no incluye a todos los pacientes con HDC pertenecientes al período de estudio, con una distribución heterogénea en edad y, por lo tanto, con distintos períodos de seguimiento, suponen una limitación de esta parte clínica del proyecto y obligan a una interpretación cautelosa de los datos obtenidos.

De cualquier forma, la principal limitación del estudio clínico se deriva de un diseño Caso-Control que ha sido incompleto. La imposibilidad de reclutar al menos a un control por cada caso disminuye la potencia estadística de nuestras comparaciones. Esta limitación se ha intentado subsanar mediante la comparación de los valores de los Casos con los valores poblacionales de referencia cuando éstos estaban disponibles, siempre ajustando por grupos de edad y sexo si era necesario.

Un valor añadido de esta valoración clínica ha sido diseñar un protocolo de seguimiento de los pacientes con HDC, aplicable tanto a los participantes en este trabajo como a los demás.

I.1 ESTUDIO DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS EN SANGRE PERIFÉRICA

I.1.1. ANALISIS DE NUESTROS RESULTADOS:

En el análisis de los resultados, tanto en la comparación con valores teóricos de referencia, como en la comparación estadística entre ambos grupos, hemos considerado finalmente los valores absolutos, descartando los porcentajes que, por ser valores relativos dependientes del resto de las poblaciones celulares, son inexactos tal y como se explica más adelante.

Además, estas alteraciones proporcionales, que afectan a los linfocitos T en sólo 3 casos (HDC2, HDC7 y HDC9), son pequeñas en todos los pacientes (mínimas en uno de ellos: HDC2) y además en el paciente HDC9 y en el único control afectado (C3), los valores son superiores a los límites normales para su edad. Más aún, comprobamos que los valores absolutos correspondientes entran dentro de los límites de la normalidad, por lo que decidimos tener en cuenta sólo estos últimos.

Por otra parte, tampoco disponemos de valores de referencia de los porcentajes para las subpoblaciones CD4Ra/Ro y CD8Ra/Ro, pues mientras que por algunos autores se calculan respecto a las poblaciones CD4 y CD8³⁶⁹, en nuestro laboratorio se hace en relación a los linfocitos totales, por lo que nuestros valores son sistemáticamente menores que en los considerados de referencia.

La segunda observación que queremos hacer en la interpretación de nuestros resultados es respecto a la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos CD4+Ra/Ro y CD8+Ra/Ro correspondientes a linfocitos vírgenes y memoria, respectivamente. Se puede comprobar que en algunas ocasiones, el sumatorio no se corresponde con el número total de linfocitos CD4+ ó CD8+, lo que se justifica primero por la variabilidad de la propia técnica, que nunca daría un mismo resultado del número de células ante dos mediciones seguidas en un mismo sujeto y, en segundo lugar, por la existencia de linfocitos “transicionales”, que expresan ambos marcadores (Ro + Ra) y por lo tanto se contabilizan en más de una ocasión, tanto con la utilización de anticuerpos frente al marcador Ro como Ra. Este hallazgo ocurre en diez pacientes con HDC y en un Control.

Los análisis de subpoblaciones linfocitarias tienen la limitación evidente de estar sujetos a procesos infecciosos intercurrentes. Por dicha razón es importante descartar para el análisis estadístico aquellos sujetos con cuadros clínicos que pudieran modificar la cuantificación de linfocitos. Así ha ocurrido en nuestro trabajo con el paciente #HDC26, con una leucocitosis evidente por un proceso infeccioso intercurrente, y el #HDC33 con leucocitosis y linfocitosis e incremento de prácticamente todas las subpoblaciones linfocitarias tanto de sus porcentajes como de los valores absolutos. Sin embargo, no hemos descartado el #HDC18 que aunque tenía unos niveles moderadamente elevados de leucocitos y linfocitos totales, se asociaban a unas cifras normales del resto de subpoblaciones linfocitarias tanto en porcentaje como en valores absolutos. Tampoco hemos descartado el control #C2, que aunque tenía leucocitosis y una baja proporción de linfocitos (con número de linfocitos totales normales), no presentaban alteraciones tampoco en el resto de las poblaciones linfocitarias.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos sobre la cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias en valores absolutos, sólo se han detectado pequeñas variaciones en tres pacientes: #HDC1, #HDC27 y #HDC30 (en las subpoblaciones CD4Ra o CD8Ra, con valores normales de las correspondientes poblaciones CD4 y CD8) en relación a los valores teóricos tomados como referencia³⁶⁹.

Con el análisis estadístico que comparó los resultados en ambos grupos, sólo se detectaron cifras significativamente menores de linfocitos T de forma aislada en la subpoblación CD8Ro en los pacientes con HDC en el grupo mayor de 2 años ($88,8 \pm 76,99/\mu\text{l}$ vs $243,28 \pm 141,14/\mu\text{l}$, $p < 0,05$).

Debemos señalar aquí, que precisamente este grupo de pacientes fue el más heterogéneo o atípico, si lo comparamos con la mayoría de las publicaciones que tratan sobre el fenotipado linfocitario de poblaciones sanas (en las que se separan diferentes grupos de edad durante el primer año de edad), ya que tuvimos que agrupar a todos los pacientes menores de 2 años por el escaso tamaño muestral en estas edades.

Estos resultados se correlacionan con lo esperado por la evolución clínica de estos pacientes durante su seguimiento a lo largo de la vida, en los que no se han descrito una morbilidad infecciosa llamativa fuera de los procesos infecciosos respiratorios que parecen tener que ver más con su neumopatía crónica y con las consecuencias del RGE, que por un déficit inmunológico primario, como ocurre en el síndrome de Di George o en otras inmunodeficiencias.

Aparte de las diferencias aisladas en el tamaño de la subpoblación CD8Ro entre ambos grupos, tampoco hemos podido confirmar variaciones subclínicas globales del resto de las células T de la inmunidad celular que justifiquen posibles disfunciones tímicas que pudiesen potenciar esta morbilidad infecciosa pulmonar, que está propiciada por otros factores no inmunológicos. Serían por lo tanto necesarios futuros trabajos con el mismo diseño caso-control, para corroborar las pequeñas alteraciones obtenidas y confirmar o descartar afectaciones subclínicas de otras subpoblaciones linfocitarias.

I.1.2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS TOTALES. EVIDENCIAS DE LA INFLUENCIA DE LA CN EN LA DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DEL TIMO:

El síndrome de Di George, de base genética conocida (deleción 22q11.2) y caracterizado por la presencia de anomalías craneofaciales, cardiopatías de patrón troncoconal, hipocalcemia e infecciones recurrentes secundarias a una inmunodeficiencia celular T, constituye un buen ejemplo de afectación neurocristal, ya que agrupa en su secuencia malformativa a órganos cuyo correcto desarrollo y función dependen en algún momento de las señales celulares y moleculares vehiculizadas por la CN durante la embriogénesis.

Además de las anomalías anatómicas de la región craneofacial, corazón, o la hipoplasia y/o ectopia tímica y de las glándulas paratiroides detectadas en autopsias³⁷⁸, la demostración de alteraciones en el número o función de los linfocitos T en estos pacientes con síndrome de Di George^{378, 379} pone de manifiesto la correspondiente alteración de la función tímica y supone además la afectación clínica más grave y con mayor influencia pronóstica en los pacientes con inmunodeficiencias severas.

Además de en el síndrome de Di George, también se han demostrado disminuciones porcentuales significativas de linfocitos totales y de las subpoblaciones CD2, CD3 y CD4 en una población de neonatos con cardiopatías troncoconales en comparación con las de niños sanos de la misma edad. La constatación de esta tendencia en los pacientes que no sobrevivieron a las malformaciones cardíacas más severas, sirvió de apoyo a la hipótesis sobre una posible relación embriológica neurocristal común entre la disfunción tímica y la de otras malformaciones de estirpe neurocristal³⁸⁰.

Trabajos similares previos en cardiopatas ya habían postulado un base inmunológica en pacientes con cardiopatías troncoconales que se manifestaban clínicamente con mayor recurrencia de procesos infecciosos y además presentaban menor porcentaje de linfocitos CD4 que otros con cardiopatías de otra índole³⁸¹. Aunque en estos casos la validez de los resultados queda limitada por el manejo de cifras porcentuales relativas (sujetas a variaciones en el resto de células linfocitarias), estos hallazgos nos animaron a la búsqueda de otros equivalentes en los pacientes con HDC.

Que el timo es un órgano de origen neurocristal es conocido desde hace varias décadas. Algunos trabajos consistentes en la ablación de zonas de la CNC en aves producen disminución del tamaño del timo o ausencia del mismo; así como retrasos en la maduración de los linfocitos, que se supone es dependiente de una correcta interacción entre los componentes epitelial y mesenquimal de los arcos faríngeos³⁸². Esta necesaria interacción entre las células mesenquimales procedentes de la CN y las células epiteliales tímicas en la linfopoiesis, se objetiva en cultivos celulares *in vitro* de timos procedentes de ratones, en los que se demuestra que los cultivos de los lóbulos tímicos a los que se les extirpa el tejido mesenquimal tienen menos linfocitos y éstos son más inmaduros en la medida en que no expresan marcadores CD4/CD8, en comparación con los timos intactos cultivados junto a su correspondiente componente mesenquimal, que contienen una adecuada proporción de poblaciones linfocitarias³⁸³.

Además, las técnicas de marcaje celular frente a antígenos neuronales en modelos quimera pollo-codorniz demostraron ya en los años 70 que el mesénquima tímico procedía de células que migraban desde la CNC¹⁷⁹. Otros trabajos más recientes que usan anticuerpos monoclonales mediante técnicas inmunohistoquímicas en preparaciones *whole-mount* en aves, han permitido seguir las vías migratorias de estas células neurocristales desde la CN hasta la región anatómica del cuello donde finalmente se forma el timo³⁸⁴. También en humanos, procedimientos de marcaje celular con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos de tejido neuronal, han permitido demostrar el componente neurocristal del timo mediante la detección de una densa expresión de antígenos de la CN en las células epiteliales de los corpúsculos de Hassall y en las mesenquimales del estroma, en timos extirpados en el periodo neonatal durante procedimientos quirúrgicos cardíacos³⁸⁵.

Las técnicas de manipulación genética también han contribuido al esclarecimiento de la morfogénesis tímica. El desarrollo de modelos animales transgénicos (*Lacz*, por ejemplo) ha sido de utilidad para el estudio de la migración y diferenciación de las células procedentes de la CN en el desarrollo del timo y demás órganos derivados de los arcos faríngeos en ratones³⁸⁶. Además, se han demostrado malformaciones tímicas cuando se alteran genes necesarios para la creación de un microambiente molecular adecuado para la correcta diferenciación de las células de la CN en los distintos órganos a los que da lugar durante los procesos de embriogénesis³⁸⁷.

Así, delecciones de los genes Wnt-1 y Wnt-4 producen disminución del número de timocitos³⁸⁸, y alteraciones en la expresión de determinados genes Hox dan lugar a malformaciones del timo y del resto de órganos derivados de la 3ª, 4ª y 5ª bolsas faríngeas. En concreto, experimentos de manipulación genética, han confirmado la producción de aplasia/hipoplasia o ectopia tímica, tiroidea y de las glándulas paratiroideas en ratones mutantes Hox3^{-63, 64, 389}. Así mismo, anomalías en otros genes como el *rae28*, que regula la expresión de algunos de estos genes Hox, o déficits en la expresión de señales moleculares como las de la familia *pax3* en la CN y en el mesénquima de los arcos faríngeos, producen también alteraciones del timo^{390, 391}.

I.1.3. METODOLOGÍA UTILIZADA. LIMITACIONES:

Para el estudio de los linfocitos T utilizamos la citometría de flujo en sangre periférica en fresco, sin la necesidad de otros procedimientos adicionales (como la congelación) que añadirían dificultad a la técnica y la encarecerían, y que son necesarios cuando se realizan otros procedimientos como cultivos celulares no planteados en este caso.

En cuanto a la interpretación de los resultados, a pesar de que los valores de cada subpoblación linfocitaria se informan en nuestro laboratorio en forma de porcentaje con respecto a los linfocitos totales, creímos necesario el cálculo de los valores absolutos (n° células/ μ l), en la valoración de posibles disminuciones en el tamaño de las poblaciones linfocitarias T como objetivo de este apartado. La sola consideración de los porcentajes linfocitarios puede inducir a errores ya que éstos pueden estar dentro de los límites de normalidad en relación al número de linfocitos totales, pero pueden ser deficitarios en valores absolutos, y viceversa, tal y como puede verse en alguno de nuestros casos (Anexo IV).

Además, se ha podido comprobar que variaciones fisiológicas de la proporción de las distintas poblaciones linfocitarias en sujetos sanos no se corresponden con los mismos cambios en las cifras absolutas de las mismas. Y, por otra parte, aumentos o disminuciones de estas proporciones de algún tipo de célula T pueden producirse como consecuencia de variaciones contrarias de otras poblaciones de linfocitos T ó B y no por cambios reales en su número absoluto. Esto demuestra que la distribución relativa de las distintas poblaciones linfocitarias no refleja su tamaño real y que tienen un valor muy limitado en el estudio del fenotipado linfocitario, por lo que se hace necesaria la cuantificación linfocitaria en valores absolutos en el estudio de alteraciones hematológicas e inmunológicas en la práctica clínica diaria³⁹².

Otro aspecto importante a tener en cuenta en cuanto a la metodología seguida es la consideración de la edad de todos los participantes del estudio, por lo que dividimos a nuestra serie de pacientes y controles en distintos grupos etarios para la comparación de los resultados obtenidos. Estudios poblacionales de fenotipado linfocitario en poblaciones pediátricas sanas coinciden en la existencia de variaciones “fisiológicas” del tamaño relativo y absoluto de las distintas subpoblaciones linfocitarias T y B a lo largo de la vida. Así por ejemplo, en condiciones normales, los linfocitos CD4⁺ disminuyen con el paso del tiempo hasta la edad adulta y los CD8⁺ siguen esta misma tendencia a partir del año de edad en números absolutos, aunque sus porcentajes se incrementan a partir de este momento^{369, 392, 393}.

A la hora de valorar los resultados obtenidos en nuestras citometrías hemos considerado dos opciones. La primera, la comparación de éstos con respecto a los valores de referencia teóricos publicados por el grupo de Shearer³⁶⁹, en el que se ofrecen los normogramas para los distintos grupos de edad de 0 a 18 años, tanto en porcentaje como en valores absolutos, y que se utilizan como referencia habitual en nuestro laboratorio.

No obstante, en cuanto a la interpretación y elección de valores de “normalidad” de cuantificación linfocitaria en niños sanos, hay que ser cauteloso y tener en cuenta que existen múltiples factores que influyen en la variabilidad de los resultados descritos en las distintas publicaciones, como pueden ser las distintas técnicas o anticuerpos utilizados, los tests estadísticos de análisis y la distribución en grupos de edad no siempre homogéneos. Sin embargo, los amplios márgenes de normalidad y de los períodos de edad ofrecidos^{369, 392} minimizan estas limitaciones, haciendo suponer que los valores fuera de estos límites son realmente anormales para esa edad en cualquier laboratorio en el que se hayan realizado las mediciones.

Como segunda opción para valorar los resultados de las citometrías, y en el intento de obviar las limitaciones derivadas de la comparación con valores teóricos de poblaciones no pertenecientes a nuestro medio con técnicas llevadas a cabo en otros laboratorios, realizamos un análisis estadístico para la comparación de los resultados reales de ambos grupos, con una distribución similar en grupos de edad y que han sido sometidos a los mismos procedimientos técnicos. La equivalencia de los resultados con las dos metodologías descarta en este trabajo alteraciones significativas del fenotipado linfocitario T que apuntasen a una potencial hipofunción de una glándula tímica malformada.

Sin embargo, y puesto que la cuantificación de las poblaciones linfocitarias son sólo un aspecto de la función tímica, y no siempre el más importante, serían necesarias pruebas adicionales que probasen la correcta función de los linfocitos T mediante el estudio de la respuesta proliferativa a mitógenos con técnicas de cultivo celular. Estas técnicas se realizan en pacientes con inmunodeficiencias probadas como en el síndrome de Di George, en los que la función de sus células linfocitarias T puede estar alterada sin que existan déficits cuantitativos asociados³⁷⁹.

En nuestro caso, no hemos considerado este tipo de procedimientos por lo que supondría en cuanto a encarecimiento del protocolo y la mayor dificultad técnica con necesidad de mayores cantidades de muestras sanguíneas en pacientes sin sintomatología claramente sospechosa de una inmunodeficiencia celular.

I.1.4 IMPLICACIONES CLÍNICAS:

Ante los resultados obtenidos no podemos confirmar alteraciones en la cuantificación ni distribución de las poblaciones linfocitarias T, que indujesen de forma aislada, a una mayor morbilidad en estos pacientes en forma de procesos infecciosos múltiples; ni tampoco variaciones subclínicas generalizadas que potenciasen los riesgos infecciosos ya existentes en estos pacientes.

I.2. ESTUDIO DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO

I.2.1. ANÁLISIS DE NUESTROS RESULTADOS:

A la vista de nuestros resultados (Tablas XV y XVII), en los que se confirmaron disminuciones de PTH sólo en 2 pacientes y en 2 controles, no se pudieron demostrar alteraciones en los parámetros del metabolismo fosfocálcico que pudieran justificarse por disminuciones de PTH secundarias a una potencial hipofunción de las glándulas paratiroides. En todos estos casos además, encontramos explicaciones fisiológicas que justifican estos descensos de PTH en sangre; tal y como se desarrolla a continuación.

Los bajos niveles de PTH detectados en los dos pacientes (#HDC7 y #HDC9) se justifican por una respuesta fisiológica de frenado de su liberación ante pequeñas variaciones del calcio plasmático, que junto a la concentración de fósforo en plasma, son los factores reguladores más importantes del metabolismo fosfocálcico.

En el paciente #HDC7 (3 años), con $PTH_i=10$ pg/ml y niveles de calcemia en un límite alto dentro de la normalidad (Ca^{2+} en plasma= $10,7$ mg/dl), debidos probablemente también a las concentraciones en rango alto de vitamina D (63 ng/ml), se produce una inhibición de la liberación de PTH para evitar una situación anormal de hipercalcemia. Otro mecanismo regulador observado en este caso es el elevado cociente Ca_o/Cr_o ($0,35$ mg/mg), que se desencadena también para mantener la calcemia en límites de normalidad.

En el paciente #HDC9 (5 años), con $PTH_i=7$ pg/ml, se confirmaban también cifras en los límites altos de la normalidad de Ca^{2+} en plasma ($10,6$ mg/dl) que inhiben de forma fisiológica y temporal la liberación de PTH. En este paciente no se detectaron niveles suficientes de vitamina D (21 ng/ml) por lo que los niveles de calcemia en rango elevado, se suponen secundarios a un alto aporte de calcio en la dieta.

Los incrementos en los valores de PTH_i detectados en otros 2 casos (#HDC1 y #HDC33) tienen también una explicación fisiológica en un intento de mantener niveles normales de calcio plasmático en pacientes con bajas concentraciones de vitamina D (5 ng/ml y 20 ng/ml, respectivamente). En ambos casos los cocientes Ca_o/Cr_o están muy disminuídos ($0,02$ mg/mg) con el objetivo de “ahorrar” calcio y mantener así la calcemia en cifras normales. El hecho de que se trate de dos pacientes con una elevada morbilidad (RGE, neumopatía crónica, cardiopatía en el caso de #HDC1; neumopatía por HTP severa en período neonatal y cardiopatía en #HDC33) con estados de desnutrición severa con pesos y tallas por debajo del percentil 3, hace pensar que los bajos niveles de vitamina D plasmáticos sean secundarios a aportes deficitarios.

Por los mismos mecanismos reguladores que en los pacientes #HDC7 Y #HDC9, los controles #C14 y #C15, de 4 años de edad, mostraban niveles bajos de PTH (6 pg/ml y 8 pg/ml, respectivamente), con concentraciones suficientes y en niveles altos de vitamina D y calcemias con tendencia a situarse en los límites altos de la normalidad.

En cuanto a la Calcitonina, ésta se informó como indetectable en el 65% de los casos y en la misma proporción en los controles. Para su medición se utilizaron métodos de enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente: CLEIA (“*chemiluminescent enzyme immunoassay*”), que son los recomendados en la actualidad por su mayor sensibilidad al detectar mínimas concentraciones de CT sérica (hasta 2pg/ml en nuestro caso), con respecto a las técnicas RIA de 1ª y 2ª generación, que detectaban niveles > 5 pg/ml, poco sensibles en el ámbito clínico^{260, 394}.

Por lo tanto, a pesar de la alta proporción de casos con valores “indetectables” de CT, el hecho de comprobar prácticamente el mismo número de controles con estas cifras, descarta desde un primer momento que estos bajos niveles sean secundarios a una hipofunción de las CC; apuntando más bien hacia causas técnicas (que se explican en un apartado posterior) o secundarias a las variaciones fisiológicas circadianas de la propia hormona. Estos hallazgos desestiman además la valoración de la función de las CC mediante la medición sérica basal de calcitonina, en el intento de investigar las repercusiones funcionales de estas células, que se han demostrado deficitarias en nuestros pacientes con HDC.

Por último, la Vitamina D, la otra hormona calciotropa, de procedencia externa y por lo tanto sin síntesis endógena en órganos cuya formación pudiese estar bajo los mecanismos reguladores de la CN, presenta sin embargo, valores diferentes entre ambos grupos que merecen también consideración.

El cálculo de sus niveles medios séricos ($26,3 \pm 11,6$ ng/ml en el grupo HDC vs $32,3 \pm 15,7$ ng/ml en el grupo Control) y el porcentaje de niños con niveles insuficientes (70% en pacientes vs 47% en los controles), confirma una tendencia menor (aunque no se ha demostrado estadísticamente significativa: $p=0,11$) en los pacientes con HDC con respecto a los controles, lo que suma un factor más de desnutrición en los mismos. Estas deficiencias estarían justificadas por los bajos aportes dietéticos, ingresos prolongados con poca exposición solar y problemas malabsortivos en el contexto de una situación de enfermedad crónica en los casos asociados a una importante morbilidad.

1.2.2. DISFUNCIÓN PARATIROIDEA EN TRASTORNOS NEUROCRISTALES

Como ocurre con la inmunodeficiencia celular, el síndrome de Di George y el resto de las enfermedades incluídas en el síndrome de delección 22q11.2, son el mejor ejemplo en humanos de secuencias malformativas en las que se afectan órganos neurocristales, entre ellos las glándulas paratiroides^{395, 396}. En dicha delección 22q11 se afectan secuencias genéticas “clave” donde asientan genes expresados en la CN craneal, lo que explica la aparición de malformaciones de perfil neurocristal, también presentes en otras enfermedades en los que se supone una disfunción de la CN, como en las cardiopatías troncoconales o en la propia HDC.

Como se comentó respecto a la formación y desarrollo del timo, se han confirmado alteraciones en la expresión de genes reguladores de la formación de las glándulas paratiroides (genes Hox y factores de transcripción Tbx, Gata3 y Sox3), tanto en humanos como en animales^{64, 397}. Mediante técnicas de mapeo genético en enfermos con síndrome de Di George y en otros portadores de malformaciones similares, se han descrito alteraciones génicas de este tipo; y en modelos *knock-out* murinos en los que se han inducido alteraciones en la expresión de estos genes, se ha confirmado hipoplasia paratiroidea^{397, 398}.

Del mismo modo que la experimentación animal ha permitido la demostración de esta participación de la CN en la formación de las glándulas paratiroides, las autopsias de pacientes con síndrome de Di George han revelado hipoplasia o ectopia de las mismas³⁹⁹, que se correlacionan con el hipoparatiroidismo causante de la hipocalcemia en estos pacientes.

Con la intención de probar una hipofunción paratiroidea en otros pacientes portadores de las mismas malformaciones de carácter neurocristal, también se han realizado mediciones séricas de Calcio y Paratohormona en éstos^{396, 400, 401}. Así, Koch et al⁴⁰¹ demostraron disminuciones de Calcio plasmático y PTH basales en pacientes con cardiopatías troncoconales y monosomía 22q.11.2; aunque sus resultados deben tomarse con cautela al ser un trabajo retrospectivo en un número limitado de pacientes y con mediciones puntuales en el tiempo.

Precisamente, el momento de la valoración de estos parámetros, junto a la ausencia de mediciones seriadas de los mismos, son las principales limitaciones a considerar en este tipo de investigaciones, incluida la nuestra. Hay que tener en cuenta que la aparición de hipocalcemia en determinadas situaciones, como en la asociada al síndrome de Di George, es mucho más frecuente en el período neonatal (por interrupción brusca del paso de calcio materno al feto y por menores aportes de calcio en los RN hospitalizados), disminuyendo notablemente la probabilidad de su aparición en épocas avanzadas de la infancia o en la adolescencia^{395, 400, 402}, por lo que la no detección de estas alteraciones en mediciones en un momento puntual como en nuestro caso, no excluye totalmente la existencia de las mismas en el período neonatal o en otras mediciones que se hubieran realizado en otro momento.

Otros autores han demostrado hipoparatiroidismos “latentes” (con normocalcemia y niveles normales de PTH séricos en situaciones basales) en pacientes con cardiopatías troncoconales en los que se provocó hipocalcemia extrema durante su corrección quirúrgica. Puesto que muchos de ellos eran portadores además de la delección 22q.11.2, y se asociaban a linfopenia T, se señaló a la CN como la causante común de las malformaciones en el corazón, timo y glándulas paratiroides, que resultaría en estos casos en el hipoparatiroidismo ante situaciones de estrés⁴⁰⁰.

Quedaría por saber, si este hipoparatiroidismo subclínico induciría a un hipoparatiroidismo de mayor grado con el paso del tiempo, lo que requeriría un seguimiento a largo plazo de la homeostasis fosfocálcica.

I.2.3 METODOLOGÍA UTILIZADA. LIMITACIONES:

La obtención de un filtrado glomerular estimado (FGE) >90 ml/min/1,73m² en todos los participantes del estudio, ha confirmado una función renal adecuada en todos ellos, y descarta así causas renales de las variaciones en las concentraciones plasmáticas y urinarias de las sustancias que participan en la homeostasis fosfocálcica. Esta comprobación es particularmente importante en la valoración de la calcemia, principal regulador de la liberación de PTH, y también de la calciuria (Calcio urinario/24h y cociente Ca_o/Cr_o en orina de micción), medida utilizada como parámetro de resorción ósea.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, la limitación de la utilización del FGE por su dependencia de la masa muscular, al influir en su cálculo los niveles de creatinina sérica (según la fórmula de Schawrtz descrita en Material y Métodos). De esta manera, el filtrado glomerular puede resultar sobreestimado en los pacientes malnutridos con escasa masa de nuestra serie.

Una alternativa para obviar este inconveniente sería el cálculo de la Cistatina C, sustancia de bajo peso molecular que se elimina completamente por filtrado, sin reabsorción renal, de producción constante en todas las células mononucleadas, y que no depende por lo tanto de la masa muscular ni del estado nutricional. Pero por su elevado coste, su principal desventaja, no se ha considerado su medición en este trabajo en el que a priori, no se esperaban alteraciones de la función renal en ninguno de nuestros pacientes y mucho menos en los controles.

Respecto a la excreción urinaria de Calcio, el diseño metodológico del estudio planteaba su cálculo a través de la medición de la calciuria en 24h (mg/kg/24h) y así se realizó en los inicios del protocolo clínico. Debido a que para su interpretación hay que confirmar una excreción urinaria de creatinina (mg/kg/24h) normal, a que su correcta medición depende de la adecuada recogida en las 24h, a que ésta es técnicamente imposible sin la utilización de métodos invasivos (sondaje uretral) en niños incontinentes y a que algunas familias declinaban la colaboración para su realización, se optó finalmente por la medición del cociente Ca_o/Cr_o en orina de micción como parámetro de medición del calcio en orina, en todos los participantes del estudio. Aunque este cociente depende de la edad (tal y como se especifica en el apartado correspondiente de Material y Métodos), se realizó una comparación generalizada de los datos entre pacientes y controles, pudiendo confirmarse el mismo valor en ambos grupos (0,18mg/mg), que se correspondía además con los valores normales para niños mayores 2 años, edad mayoritaria en ambos grupos.

En cuanto a la valoración de Calcitonina, la existencia de umbrales inferiores de detección en los tests de cuantificación, y de que éstos varíen en función de la sensibilidad de la técnica empleada, ha supuesto en nuestro caso la alta proporción de valores informados como indetectables en ambos grupos, y hace que la medición sérica aislada y basal de CT sea ineficaz y no válida en la detección de niveles insuficientes de la misma.

De hecho, en la práctica clínica, la principal indicación de la medición sérica de CT es en el seguimiento del carcinoma medular de tiroides, que se manifiesta con una elevación de sus concentraciones séricas en respuesta a la hiperplasia de células C. Pero incluso en estas indicaciones, también se ha cuestionado la eficacia de su cuantificación basal ante situaciones en las que es necesario detectar pequeñas variaciones en sus niveles, como en el diagnóstico precoz de este tipo de tumores. En estos casos se han propuesto pruebas de estimulación con pentagastrina y/o calcio, no aceptadas universalmente por la posibilidad de aparición de efectos secundarios graves durante la realización de las pruebas⁴⁰³ y por supuesto no planteadas en este trabajo.

Todos estos aspectos nos llevan a concluir por lo tanto, en la ineficacia de la medición sérica basal de CT como una herramienta válida para la valoración funcional de las células C tiroideas, que por otro lado se han demostrado deficitarias en los estudios histológicos llevados a cabo en las necropsias de pacientes con HDC de nuestro trabajo.

Respecto a la Vitamina D, se cuantificó el Calcidiol (25-OH-vitamina D) en todos los sujetos, que por ser la forma química más estable y más fácilmente medible, es el metabolito que se mide de forma habitual en la clínica; incluso en el seguimiento de pacientes con insuficiencia renal crónica.

Finalmente, y en relación a todos los parámetros del metabolismo fosfocálcico, hay que tener en cuenta que todas las mediciones son únicas y puntuales en el tiempo, en distintos momentos de seguimiento de los pacientes, por lo que no se pueden descartar alteraciones analíticas en otras situaciones. Es cierto sin embargo, que aun en el caso de que estas posibles alteraciones de la homeostasis fosfocálcica tuviesen que ver con anomalías anatómicas groseras, sería esperable que las alteraciones analíticas fuesen constantes en el tiempo.

I.2.4. IMPLICACIONES CLÍNICAS:

Valorados nuestros hallazgos, no se han podido demostrar consecuencias analíticas del metabolismo fosfocálcico basal, aun en el caso de que nuestros pacientes con HDC presentasen hipotéticas malformaciones de las glándulas paratiroides o de las células parafoliculares tiroideas, tal y como se ha demostrado que existen en el modelo experimental.

Sin embargo, el diagnóstico de hipoparatiroidismo pudiera estar infraestimado por no haber sido evaluado de forma rutinaria en el período neonatal, en el que es más probable, ni en determinaciones seriadas. Por eso sería recomendable en estos pacientes la valoración de la calcemia durante la época neonatal o en situaciones de estrés en las que puede existir deplección de calcio (intervenciones quirúrgicas, por ejemplo), y en las que podría manifestarse un posible hipoparatiroidismo latente.

Respecto a la Calcitonina, y a pesar de las limitaciones metodológicas comentadas respecto a su valoración, que pueden haber impedido conocer la repercusión analítica de las anomalías histológicas detectadas en nuestros pacientes, dudamos de que, aun en el caso de que se hubiesen detectado niveles insuficientes de CT, hubiesen tenido repercusión clínica debido al escaso papel de esta hormona en la regulación del metabolismo fosfocálcico. Dicho papel ha sido muchas veces cuestionado en humanos, pues habitualmente en los pacientes tiroidectomizados no se producen alteraciones en la homeostasis cálcica.

Finalmente, los menores niveles de Vitamina D séricos confirmados en el grupo HDC, justifican en nuestra opinión, su medición rutinaria en busca de la detección precoz de niveles insuficientes de la misma, que pudiesen favorecer una situación de osteopenia u osteoporosis futura en estos pacientes con factores de riesgo y más vulnerables.

I.3. VALORACIÓN DE LA MASA ÓSEA

I.3.1. ANÁLISIS DE NUESTROS RESULTADOS:

Según nuestros resultados, casi la mitad (42%) de los pacientes a los que se practicó densitometría ósea (11/26), presentaban disminución de masa ósea en mayor (osteoporosis) o menor grado (osteopenia).

Visto como dato aislado puede parecer significativo, pero una vez revisados los antecedentes clínicos, o factores constitucionales como la talla, el peso o la situación nutricional de cada caso (Tabla XXV), en 5 de los 11 con alteraciones densitométricas se encuentran justificaciones que en alguna medida pueden haber influido en estos resultados.

No obstante, hay que tener en cuenta también la variabilidad de su influencia en los distintos casos, ya que no siempre los factores clínicos más severos o los mayores retrasos pondoestaturales se han correlacionado con los peores valores de mineralización ósea. Y, por otra parte, otros pacientes con gran morbilidad asociada y hospitalizaciones prolongadas no han presentado defectos de mineralización.

A continuación se detallan los antecedentes clínicos que se han considerado como posibles favorecedores de una situación de osteopenia u osteoporosis en los pacientes afectados:

HDC11: 5 años. Sepsis neonatal y politransfusión en dicho período. Anemia multifactorial durante los primeros dos años de edad. RGE y problemas para nutrición oral que requirieron la intervención quirúrgica (Nissen) y nutrición suplementaria por gastrostomía hasta los 4 años de edad. Neumopatía crónica que requirió oxigenoterapia domiciliaria durante el primer año de vida. Talla baja (DE= -2,27) en tratamiento con hormona de crecimiento (GH).

HDC17: 2 años. Hipoplasia pulmonar confirmada gammagráficamente. Neumopatía crónica. Talla baja (DE=-5,04).

HDC13: 4 años. Nefrectomía por displasia renal a los 2 años de edad. RGE tratado quirúrgicamente mediante la realización de técnica antirreflujo (Nissen) y gastrostomía para alimentación enteral complementaria. Reintervención por obstrucción intestinal. Talla baja (DE=-2,5).

#HDC3: 13 años. Peso (DE:-1,44). Malnutrición moderada-grave (I. Waterlow=78,3%; I. Shukla=70,4%). Hipoplasia pulmonar. Asma persistente, con antecedentes de tratamientos prolongados con corticoides. RGE severo con esofagitis que requirió tratamiento quirúrgico (Nissen). Corrección quirúrgica de pectus excavatum a los 9 años

#HDC7: 3 años. Retraso pondoestatural (peso: DE: -2,47 y talla: DE: -1,93); malnutrición moderada-grave (I. Waterlow=71,4%; I. Shukla=67%). Múltiples intervenciones quirúrgicas por RGE y reherniación diafragmática. Intolerancia para la alimentación oral: necesidad de nutrición enteral suplementaria por gastrostomía.

A la hora de interpretar estos resultados y de la valoración de los posibles factores influyentes en los valores de la densitometría, debemos considerar el papel de la talla de cada paciente, que cuando es inferior a la normalidad, no sólo puede traducir déficits nutricionales que también ocasionen alteraciones de la mineralización, sino que además puede condicionar una infravaloración de la DMO en la medida en que ésta depende de la altura vertebral del área explorada y por lo tanto de la altura de cada individuo. Creemos que esta influencia ha podido ser mayor sobre todo en los pacientes #HDC11, #HDC13 y #HDC17 con tallas con DE inferiores a -2 DE.

En este sentido, observamos que casi la mitad (45%) de los pacientes con déficits de mineralización asocian disminuciones de la talla en mayor o menor medida, aunque no siempre existe una correlación entre las alteraciones de la talla y el grado de osteoporosis; y por otro lado, todos los pacientes con densitometrías normales (excepto el paciente HDC23 con Z-score normal y talla con DE= -1,95) tenían una altura adecuada para su edad y sexo. Estos hallazgos corroboran por lo tanto, la correlación positiva entre la DMO, la talla y la edad, y por lo tanto la influencia en mayor o menor grado de la talla en los valores de masa ósea^{280, 289}.

Continuando con la valoración de posibles factores favorecedores de osteopenia, comprobamos que ninguno de los pacientes con osteopenia u osteoporosis mostraba alteraciones en los parámetros del metabolismo fosfocálcico que, como un exceso de PTH o un déficit de calcitonina, hubieran podido justificar las disminuciones de masa ósea. Únicamente se detectaron niveles insuficientes de Calcidiol, mucho más frecuentes en los pacientes con HDC que en los controles; pero también en los que no han mostrado alteraciones en la densitometría.

El hecho de no haber podido demostrar alteraciones de la homeostasis fosfocálcica en los pacientes con déficits de mineralización, descarta, al igual que en la valoración del metabolismo fosfocálcico, causas anatómicas malformativas en las glándulas paratiroides o en el tiroides que hubiesen podido producir alteraciones en las hormonas calciotropas (PTH y Calcitonina) y desequilibrios en la formación y resorción óseas con osteopenia como efecto final.

Las otras “alteraciones” encontradas en estos pacientes están en relación a variaciones en los cocientes de excreción urinaria de Calcio/Creatinina (Ica_0/Cr_0) de los pacientes #HDC7, #HDC17, y #HDC21, así como una disminución de la concentración de PTH_i plasmática en el paciente #HDC7, como una respuesta fisiológica correcta para mantener un adecuado nivel de calcemia ante pequeñas variaciones de calcio sérico, tal y como se explicó en el estudio del metabolismo fosfocálcico.

No disponemos de datos de masa ósea en los dos pacientes (#HDC1 y #HDC33) en los que se detectaron niveles elevados de PTH_i , que en cualquier caso respondían también un mecanismo fisiológico para la consecución de una calcemia normal ante concentraciones insuficientes de vitamina D.

Finalmente, en 3 de los 4 pacientes con los valores más severos de osteoporosis (#HDC18: Z-score=-2,6; #HDC19=-3,2 y #HDC28=-3,3) no se han encontrado alteraciones en el peso, talla o índices nutricionales, ni tampoco antecedentes clínicos que puedan explicar sus malos resultados. Pero tampoco podemos confirmar en estos pacientes otras hipótesis que apuntasen a una potencial disfunción neurocrystal de las glándulas paratiroides o de las células parafoliculares, debido al escaso número de casos (sólo 3) y a la confirmación del correcto estado analítico del equilibrio fosfocálcico en ellos.

Todo esto, obliga a la interpretación cautelosa de nuestros resultados, que han sido extraídos de una serie pequeña de pacientes y de forma transversal a partir de mediciones analíticas y radiológicas puntuales.

I.3.2 METODOLOGÍA UTILIZADA. LIMITACIONES:

Para el estudio del estado de masa ósea hemos utilizado la densitometría ósea lunar de doble energía, considerada como la técnica de imagen “gold standard” en la población pediátrica: por su alta sensibilidad y especificidad y su seguridad, ya que utiliza bajas dosis de radiación⁴⁰⁴. Además, permite el estudio del hueso trabecular, metabólicamente más activo y más sensible a los cambios metabólicos; razón por la que la hemos aplicado en nuestros pacientes sobre el área vertebral L₂-L₄.

Al ser una prueba no invasiva, que no requiere la necesidad de anestesia o de la administración de fármacos para su realización, la convierte además en la técnica ideal en la valoración de la mineralización ósea en el campo de la investigación clínica²⁸⁹, más aún en la población pediátrica.

Aunque la medida más exacta de cuantificación de masa ósea sería la densidad mineral ósea volumétrica (DMOV), en la que el contenido mineral óseo (g de hidroxapatita) se relaciona con el volumen vertebral (cm³), nosotros hemos optado por la medición de la DMO expresada en gramos de hidroxapatita por unidad de superficie ósea (en cm²). La dificultad para el cálculo del volumen vertebral y la menor precisión en su medición, junto a la buena correlación demostrada entre DMOv y DMO, justifican en este caso la utilización de este último parámetro, tal y como se realiza habitualmente en la práctica clínica y en la gran mayoría de las publicaciones existentes^{286, 287}.

En la interpretación de los resultados, hemos calculado en cada caso, el valor real de Z-score (o DE ajustada a la edad y sexo según patrones establecidos para niños sanos de la misma edad), en función de la DMO obtenida y la media y la DE teóricas de la misma.

Hay que tener en cuenta sin embargo, que se han descrito variaciones en los rangos de normalidad entre niños de diferentes comunidades, por lo que se pueden producir pequeñas diferencias en el Z-score calculado en función de la población sana tomada como referencia²⁷⁰.

Precisamente, la disposición de valores de referencia “normales” para cada edad y sexo, extraídos de estudios poblacionales en niños sanos, nos ha permitido prescindir de la realización de densitometrías óseas en nuestros controles (en los que no son esperables variaciones significativas de la normalidad), lo que hubiera encarecido y prolongado el procedimiento de nuestro protocolo clínico en ausencia de un criterio claramente justificado.

Por último, aunque la medición de los parámetros bioquímicos de formación (PICP, PINP) y resorción ósea (ICTP, Ntx), son la otra herramienta útil en la valoración del metabolismo óseo²⁷⁸, la hemos desestimado en nuestro protocolo por ser una prueba no utilizada de forma rutinaria en nuestro hospital, que hubiera requerido en nuestro caso del envío de las muestras para su valoración a otros centros y que además, no creímos justificada por carecer de ventajas frente a la densitometría en la detección de osteoporosis.

I.3.3 IMPLICACIONES CLÍNICAS:

A la vista de nuestros hallazgos y de las observaciones tenidas en cuenta, no podemos concluir sobre la existencia de implicaciones clínicas a nivel del hueso, secundarias a una posible hipofunción de las glándulas paratiroides y/o de las células C productoras de calcitonina, en la medida en la que se ha confirmado una correcta regulación del metabolismo fosfocálcico en todos los pacientes.

Sin embargo, ante la detección de una elevada proporción de pacientes con algún grado de osteopenia u osteoporosis junto a un alto porcentaje también de niveles insuficientes de vitamina D en la mayoría de los casos (8/11), hace recomendable su medición sérica y de la DMO mediante densitometría, en el seguimiento de estos pacientes. En ellos, la detección de osteopenia/osteoporosis y el inicio de un tratamiento sustitutivo precoz, permitiría la consecución de un pico de masa ósea adecuado, fundamental durante los primeros años de vida^{270, 280, 296}, evitando así la progresión de situaciones de osteopenia hacia estados de osteoporosis en la edad adulta, favorecidas en estos pacientes por los factores clínicos asociados.

Paciente	Densitometría		Peso (DE)	Talla (DE)	I. Waterlow	I. Shukla	Metabolismo Fosfocálcico	F. Clínicos
	DE	Z-score						
HDC2	-1,42	-1,4	-0,81	-0,96	93,7%	87,7%	Vitamina D= 24 ng/ml (↓)	No
HDC8	-1,48	-1,01	-0,53	-0,63	82,8%	87,1%	Vitamina D= 18 ng/ml (↓)	No
HDC11	-1,41	-1,3	-1,87	-2,27	ND	ND	Vitamina D= 20 ng/ml (↓)	Si
HDC17	-1,66	-1,4	-1,82	-5,04	113%	98,9%	C. Ca _o /Cr _o = 0,05 (↓)	Si
HDC21	-1,58	-1,528	-0,21	-0,36	99,3%	98,4%	C. Ca _o /Cr _o = 0,05 (↓)	No
HDC18	-2,27	-2,625	-0,9	-0,87	92,7%	90%	Vitamina D= 19 ng/ml (↓)	No
HDC13	-2,4	-2,4	-2	-2,5	85,4% (I)	78,1%	Vitamina D= 24ng/ml (↓)	Si
HDC3	-3,14	-3,07	-1,44	-1,18	78,3%	70,4%	Vitamina D= 15 ng/ml (↓)	Si
HDC7	-3,19	-3,20	-2,47	-1,93	71,4%	67%	PTH = 10 pg/ml (↓) C.Ca _o /Cr _o = 0,35 (↑)	Si
HDC19	-3,16	-3,21	-0,8	-0,38	90,9%	89,2%	Vitamina D= 23 ng/ml (↓)	No
HDC28		-3,3	PI2		ND	ND	Vitamina D = 13 ng/ml (↓)	No

Tabla XXV: Tabla que resume las características antropométricas y nutricionales de los pacientes con HDC en los que se detectó osteopenia u osteoporosis. Así mismo, se incluyen las variaciones detectadas de los parámetros del metabolismo fosfocálcico y la presencia o ausencia de antecedentes clínicos que puedan haber contribuido al correcto desarrollo pondoestatural y nutricional y por lo tanto al déficit de masa ósea. Las cifras sombreadas se corresponden con alteraciones en el parámetro valorado. **C. Ca_o/Cr_o:** Cociente Calcio/Creatinina en orina.

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TIROIDES EN AUTOPSIAS DE PACIENTES CON HDC

2.1. ANÁLISIS DE NUESTROS RESULTADOS:

Nuestros hallazgos confirman una menor cantidad de CC productoras de Calcitonina en los pacientes con HDC ($0,035 \pm 0,030$ % vs $0,072 \pm 0,052$ %, $p < 0,05$), lo que corrobora los hallazgos publicados a este respecto en humanos con otras patologías de estirpe neurocristal, mediante la utilización de otros procedimientos metodológicos^{163, 371, 405}.

Así mismo, nuestras observaciones se correlacionan con las descritas previamente por nuestro grupo en el modelo HDC-nitrofen, lo que demuestra una vez más el paralelismo entre el modelo animal y el humano en todo su espectro malformativo. También se corresponden con lo observado en la atresia esofágica experimental, que comparte con la HDC malformaciones de perfil neurocristal^{159, 162}.

Aunque nuestro procedimiento metodológico lleva implícito la consideración del área parenquimatosa explorada (superficie teñida/superficie explorada), la comprobación de que las muestras histológicas de ambos grupos eran homogéneas en tamaño ($CDH = 73,99 \pm 22,69 \text{ mm}^2$, Controles = $70,56 \pm 22,96 \text{ mm}^2$; $p > 0,05$), minimiza posibles sesgos que pudieran producirse si unos tiroides fuesen mucho mayores que los del otro grupo, en el que se hubieran hecho un número significativamente mayor de mediciones.

2.2. DISMINUCION DE LAS CÉLULAS C: OTRA ALTERACION NEUROCRISTAL EN LA HDC

El tiroides y las otras glándulas cervicales derivadas de las bolsas faríngeas (timo y las glándulas paratiroides), desarrollan su mesénquima a partir de la diferenciación de células procedentes de la CN. Estas glándulas se ven afectadas de forma constante en animales con HDC y también se han descrito, aunque en menor proporción, en humanos, en los que no se ha investigado aún la afectación de las CC tiroideas^{14, 43, 63, 398}. Esto hace suponer que su desarrollo esté influenciado probablemente por los mismos mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de la HDC, que influirían a la vez en la función organogénica de la CN durante la formación de los arcos faríngeos^{43, 49, 90}.

Por otra parte, la demostración de la escasez de células parafoliculares tiroideas en pacientes con enfermedades de estirpe neurocristal, como el Síndrome de DiGeorge, o las cardiopatías troncoconales^{163, 371, 405}, o en otros modelos animales como el de la atresia de esófago¹⁶² que comparte con la HDC un complejo malformativo similar, ha justificado en nuestro caso el estudio de estas CC en pacientes con hernia, en busca de un nuevo componente neurocristal en estos enfermos, no investigado hasta el momento.

De hecho, la disminución en el porcentaje de la superficie tiroidea teñida encontrada en este estudio, que traduce de forma indirecta la escasez de CC tiroideas en estos pacientes, representa la evidencia de otra alteración de la CN no descrita anteriormente en pacientes con HDC.

2.3. METODOLOGIA UTILIZADA. LIMITACIONES:

La investigación de las CC en los distintos ámbitos se ha basado en técnicas histométricas de cuantificación celular en las muestras histológicas.

Las primeras desarrolladas en humanos en los años 70 por Wolfe en tiroides sanos, basadas en tinciones inmunohistoquímicas específicas y cuantificación directa de las CC en imágenes microscópicas proyectadas, sentaron las bases de la distribución normal de esta población celular en el tercio medio de ambos lóbulos tiroideos, de forma aislada y con una disposición predominantemente parafofolicular^{248, 254}.

Otras más recientes se han basado en el método geométrico de “la rejilla”^{163, 249, 250, 371}, descrito por primera vez en 1979 por Saito⁴⁰⁶ en el estudio celular de los islotes pancreáticos. Éstos se han aplicado predominantemente en la especie murina, con glándulas tiroideas de pequeño tamaño y más manejables. Se basan en métodos histométricos con técnicas de medición esteorológica^{249, 250}, y han permitido un estudio detallado de las muestras histológicas en cuanto a cambios en el volumen, tamaño, cantidad, densidad, forma y distribución de cada tipo celular, además de mediciones volumétricas y de superficie de toda la glándula tiroidea^{249, 250}.

A pesar de los avances en estos métodos histométricos, en el caso de la investigación de las CC, cabe señalar las limitaciones que aún existen en la consecución de resultados y la interpretación de los mismos; debido a dos factores fundamentales. En primer lugar, por la variabilidad y distribución irregular de las CC, tanto entre las distintas especies animales como dentro de una misma especie^{248, 250}. En segundo, por la variedad de procesos metodológicos utilizados tanto en el procesamiento de las muestras histológicas como en los distintos métodos de cuantificación, lo que ha derivado en la publicación de resultados heterogéneos, incluso contradictorios en algunas ocasiones. Así por ejemplo, se han descrito tanto hiperplasia e hipertrofia de las CC, como disminución de las mismas, ante situaciones de hipo o hipertiroidismo, tanto en ratas como en la especie humana^{242-244, 407-411}.

En nuestro trabajo, en el intento de obviar las variaciones normales de las CC en el tiroides humano y para la consecución de resultados lo más objetivos posibles, se han examinado muestras histológicas “equivalentes”, correspondientes a cortes de niveles comparables de ambos lóbulos tiroideos, en el tercio medio del tiroides a nivel del istmo, región más poblada por este tipo de células en la especie humana^{248, 405}.

Entre la variedad de tinciones disponibles para el estudio de las CC, hemos utilizado, como en los estudios más recientes, la técnica inmunohistoquímica de reacción de inmunoperoxidasa con anticuerpos anticalcitonina^{236, 245}, ventajosa por su alta especificidad, capaz además de detectar la presencia de CC en cualquier momento del desarrollo tiroideo; siendo también más sensible que otras como las tinciones con plata (argirófilas), que son poco precisas para el estudio de estas células durante los primeros días de vida²⁵¹.

Como se ha comentado anteriormente, la falta de homogeneidad en las técnicas utilizadas por los distintos autores y grupos en el estudio de las CC, ha derivado en algunos casos en resultados no concluyentes o contradictorios que deben tenerse en cuenta en cada caso. En este sentido, nuestro estudio, con otro método diferente de cuantificación celular, requiere por lo tanto la consideración de algunas limitaciones metodológicas que citamos a continuación.

En primer lugar, hemos empleado la proporción de superficie teñida con respecto a la superficie tiroidea total como medida indirecta de la cantidad de CC, en lugar del número absoluto de células como se ha publicado anteriormente en otras especies animales^{159, 162}, debido a la marcada discrepancia en el tamaño del tiroides entre las muestras histológicas del modelo animal y humano. Como se ha comentado anteriormente, el conteo de las CC teñidas en las secciones tiroideas de ratas que pueden observarse en su totalidad en un campo microscópico es más fácil y reproducible que en las grandes secciones humanas, en las que la valoración de áreas teñidas proporcionales a la superficie total de cada sección tiroidea es, creemos, más precisa.

En segundo lugar, esta medición de las áreas teñidas está sometida a la valoración subjetiva del investigador, que ha sido evitada lo máximo posible mediante el estudio con un software de análisis de imagen computarizado (*Image Pro Plus v5.0.1, Media Cybernetics, USA*) por dos observadores independientes y ciegos a la adscripción de cada sujeto al grupo experimental correspondiente.

Por último, otro aspecto a tener en cuenta es la disposición tridimensional de las CC, que puede producir pequeñas variaciones en las distintas secciones tiroideas, similares en grosor; pero no idénticas²⁴⁸.

3. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS. MALFORMACIONES CERVICOTORACICAS

El objetivo principal de este apartado fué el estudio mediante MRM de posibles alteraciones venosas en animales con HDC expuestos a nitrofen. Además, basándonos en la gran utilidad de la resonancia como herramienta metodológica en el ámbito de las malformaciones congénitas, aprovechamos su empleo para examinar los principales órganos torácicos y abdominales afectados en el complejo malformativo de esta enfermedad.

3.1 ANÁLISIS DE NUESTROS RESULTADOS

Los exámenes radiológicos con MRM evidenciaron las mismas anomalías descritas tradicionalmente mediante técnicas histológicas y microquirúrgicas en el complejo malformativo de la HDC y de las que se comentan los hallazgos más importantes a continuación.

En cuanto a la localización del defecto diafragmático, a pesar de que las más frecuentes fueron HDC izquierdas (10/19), obtuvimos una elevada proporción de localizaciones derechas (7/19: 37%), excesiva según la metodología propia del modelo, que puede justificarse por pequeñas variaciones en el momento de administración del teratógeno.

También la obtención de 2 defectos diafragmáticos bilaterales supuso un porcentaje elevado (10%) en comparación con lo descrito tanto en animales como en humanos (1-2%). La observación de un rodete diafragmático anterior en las imágenes en estos últimos casos se correlaciona bien con la misma disposición observada en los hallazgos quirúrgicos en los pacientes intervenidos con agenesia diafragmática bilateral. Llama la atención también la ausencia de saco herniario en todas las exploraciones, hallazgo que se ve ocasionalmente en los pacientes intervenidos de HDC.

Timo: la significativa hipoplasia tímica confirmada en este estudio en los tres planos espaciales demuestra una vez más la exactitud de la MRM en la valoración de las distintas estructuras de estos pequeños animales, y que se correlaciona con los hallazgos anatómicos microquirúrgicos e histológicos descritos tradicionalmente en el complejo malformativo inducido con nitrofen^{14, 43, 90}.

Además de mostrar el timo con una alta resolución en un corto tiempo de exploración y de forma menos laboriosa a los métodos tradicionales de experimentación, la MRM ha sido capaz en este trabajo de discriminar también zonas de mayor señal grasa en el centro de la glándula, aportando información sobre cambios histológicos en la misma que no han sido estudiados aún. La diferencia de tamaño de los animales con HDC y los controles, hizo necesario relativizar, como en el resto de las mediciones de las distintas estructuras, los tamaños absolutos de la glándula en relación al tamaño de una referencia anatómica tomada como constante. El timo fue el primer órgano valorado y se tomó como referencia la altura del cuerpo vertebral C3 por ser fácilmente identificable y medible en todos los animales.

Árbol Traqueobronquial: La detección de deformidades de la vía aérea en forma de anillos traqueales irregulares en 6 casos (31,5%), coincide con el diagnóstico de anomalías traqueales y bronquiales (disminución en el número de anillos traqueales, estenosis o fragmentación de los mismos a nivel de la tráquea o de los bronquios principales), demostrados previamente con técnicas histológicas en este mismo modelo⁵.

Estas alteraciones se han interpretado como un componente malformativo más provocado por el nitrofen y regulado por la CN, dado que aparecen en un elevado porcentaje de animales expuestos a este teratógeno, con o sin HDC, así como en otros modelos animales que reproducen complejos malformativos neurocristales como la atresia de esófago inducida con adriamicina⁴¹². En este sentido, los déficits inervatorios traqueobronquiales intrínsecos demostrados recientemente por nuestro grupo experimental, suman una nueva evidencia en estos sentido en la HDC causada por nitrofen^{131, 161}.

La dilatación de los bronquios principales en 4 de nuestros fetos con HDC podría quizás interpretarse como la consecuencia anatómica de esta posible inervación bronquial deficiente, aunque el hecho de que todos estos casos asocien una severa atrofia del parénquima pulmonar circundante, apunta también a esta hipoplasia pulmonar como la causante de estas anomalías.

Hipoplasia Pulmonar: como era lo esperado, la mayoría de los fetos con HDC (68%) presentaban algún grado de hipoplasia pulmonar en el lado del defecto diafragmático, y en el 21% bilateralmente. Sería esperable una mayor prevalencia aún si se hubieran examinado radiológicamente todos los fetos, ya que ésta estaría presente también en un porcentaje de animales expuestos a nitrofen que no asociasen HDC, hecho sobre el que se basa la hipótesis sobre el origen malformativo de la hipoplasia pulmonar en esta enfermedad^{39, 119}.

Sin embargo, hay que tener en cuenta también que la hipoplasia pulmonar es un concepto tanto funcional como anatómico, lo que limita la validez de la MRM como único método para su medición.

Corazón y grandes vasos arteriales: las secuencias espín-eco ponderadas en T2 y las reconstrucciones multiplanares y en 3D, han facilitado su descripción anatómica en gran detalle y la detección precisa de las malformaciones presentes. Tanto su frecuencia (78%) como el tipo de MCV que representan alteraciones troncoconales y del desarrollo de los arcos aórticos, siguen la distribución esperada en los fetos con HDC. Destaca sin embargo la ausencia de defectos septales auriculares y de las regiones aurículoventriculares, también de estirpe neurocristal y frecuentes en estos pacientes y que no han podido descartarse completamente al no haberse explorado radiológicamente a todos los fetos del grupo nitrofen.

La hipoplasia cardíaca detectada en 3/19 fetos con HDC se corresponde con la descrita en el mismo modelo mediante métodos histológicos por nuestro propio grupo^{12, 13, 47}. Sin embargo, como ocurre con la hipoplasia pulmonar, la MRM ofrece un diagnóstico anatómico de hipoplasia cardíaca, sin que sea capaz de determinar la existencia de una alteración de la función cardíaca secundaria a esta hipoplasia.

Sistema Venoso Sistémico Cervicotorácico: Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una disminución del tamaño de las principales venas sistémicas del cuello y tórax en los animales con HDC en comparación a las del grupo control. Esto hace suponer que se trate de una anomalía cardiovascular más con un probable origen neurocristal común al del resto de las MCV en esta enfermedad. Además, el hecho de que esta disminución de los calibres venosos no guarde relación con la localización de la hernia apunta una vez más a un origen malformativo y excluye en este caso posibles causas mecánicas que pudieran distorsionar el tamaño vascular.

Vena Cava Inferior: a pesar de que su estudio no es objeto primordial en este trabajo, nos parece interesante comentar determinados aspectos descubiertos sobre su disposición anatómica, diferenciadores de la especie murina con respecto a la especie humana. Se observó una diferencia muy marcada en el calibre de la VCI abdominal a nivel infrahepático, siendo aproximadamente un tercio menor en la región inferior a la confluencia de las Venas Suprahepáticas en comparación a la porción superior de la desembocadura de éstas. Esta variación de tamaño se confirmó en ambos grupos, pudiendo interpretarse como un importante aflujo sanguíneo del sistema hepático en este modelo animal.

También, se evidenció de forma característica una disposición lateral de la desembocadura de las Venas Suprahepáticas en la VCI, a modo de drenaje termino-lateral, también en todos los animales, lo que hace suponer que se trate de una disposición anatómica habitual característica de la especie murina y no algún defecto malformativo o una disposición anormal secundaria a la herniación diafragmática.

Los distintos patrones de distorsión de su recorrido descritos anteriormente (en el apartado correspondiente de Resultados) aparecen constantes según la localización de la HDC sea derecha o izquierda, quedando justificadas por lo tanto por las causas mecánicas de la herniación visceral torácica. Aún así, nos parece llamativo el acodamiento de la VCI infrahepática en las HDC derechas, probablemente secundaria a la herniación hepática, sin que se encuentre una justificación objetiva al recorrido inalterado de su porción más proximal, constante en todos estos casos.

Por otra parte, la ausencia de trayecto de la VCI entre el parénquima pulmonar a nivel torácico en los animales con HDC derecha (presente en todos los Controles), con un recorrido exclusivamente hepático, podría justificarse por la existencia de hipoplasia pulmonar en esa localización.

Por último, se demostró una disminución significativa del diámetro anteroposterior de la VCI a nivel infrahepático en los animales con HDC ($0,3 \pm 0,12 \text{ mm}$ vs $0,41 \pm 0,09 \text{ mm}$, $p=0,01$), hallazgo que podría deberse a causas mecánicas por lo que pudiera repercutir la herniación diafragmática en los órganos abdominales, incluida la VCI. Sin embargo, y aunque no existan hasta el momento datos experimentales sobre su posible origen neurocristal, no podemos descartar causas malformativas en esta región de la VCI, que por otra parte es más lejana a la región diafragmática que la porción suprahepática.

3.2. DESARROLLO DEL SISTEMA VENOSO SISTÉMICO Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA CN: DATOS EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS.

Como se ha comentado en varias ocasiones en este estudio, la existencia de MCV en la HDC es ampliamente conocida y se han estudiado detalladamente tanto en los pacientes como en el modelo animal mediante estudios anatómicos de autopsias y en fetos de rata expuestos a nitrofen, respectivamente^{12, 14, 146, 413}.

Todas las investigaciones en este sentido han demostrado de forma constante una afectación del tronco cono y de la septación cardíaca así como anomalías del desarrollo de los arcos aórticos, poniendo de manifiesto una alteración de las funciones reguladoras de la CN como mecanismo común originario de tales defectos malformativos^{43, 414}.

Todas estas anomalías se refieren por lo tanto al polo arterial cardíaco y hasta el momento no se han descrito hallazgos similares en las principales venas que drenan en el corazón. Esto puede ser debido en gran parte a que las investigaciones en los modelos experimentales basadas tradicionalmente en estudios anatómicos mediante técnicas de microdissección muy meticulosas, hayan obviado el examen de la anatomía venosa por su gran dificultad de manipulación.

Es probable también, que la menor repercusión clínica de las anomalías venosas haya contribuido al menor interés de su investigación en esta enfermedad, lo que ha podido derivar en un probable infradiagnóstico en los pacientes con HDC en el caso de que existieran.

Sin embargo, algunas publicaciones sobre la dificultad para la canalización de venas yugulares, anormalmente pequeñas o distorsionadas para el tratamiento con ECMO en pacientes con HDC severa^{415, 416} señalan la posibilidad de una afectación añadida del polo venoso cardíaco en estos pacientes.

Además, a partir de los últimos años de la década de los 90, experimentos sobre ablación de CN en modelos quimera ave-codorniz e investigaciones mediante técnicas de manipulación genética con modelos murinos transgénicos e inyección retroviral de células progenitoras de la CN marcadas inmunohistoquímicamente, han confirmado la participación de la CN en el desarrollo del sistema venoso mediante la detección de células neurocristales en las venas cardinales anteriores^{306, 316, 417}.

Este tipo de experimentos han demostrado también la presencia de células procedentes de la CN en otras estructuras del polo venoso cardíaco (sistema de conducción y válvulas cardíacas) y en los ganglios y nervios del SN autónomo (Simpático y Parasimpático)^{304, 417, 418}, además de la colonización de las principales arterias cervicotorácicas derivadas de los arcos aórticos III, IV y VI (aorta ascendente y arco aórtico, arteria carótida y subclavia) y del troncocono cardíaco³⁰⁶. Asimismo, la utilización de estas técnicas de manipulación genética, que hacen posible el estudio celular individual y permiten investigar la migración y diferenciación celular, han podido demostrar mecanismos citológicos y moleculares específicos de la CNC en su función reguladora de la organogénesis cardíaca, como fenómenos de apoptosis en el proceso de septación aortopulmonar^{302, 417}, que, aunque no investigados, podrían estar implicados también en el desarrollo venoso.

Todos estos hallazgos que confirman una participación de la CNC en el desarrollo del polo venoso cardíaco y al menos en las principales venas de flujo cardíaco, nos han llevado en nuestro caso a investigar un posible maldesarrollo de las venas sistémicas cervicotorácicas en el modelo de HDC inducida con nitrofen, modelo que ya se ha relacionado con alteraciones en ambiente regulador de la CNC durante la formación del corazón y sus grandes vasos.

3.3. LA RM COMO HERRAMIENTA EN ESTUDIOS EXPERIMENTALES. NUESTRA EXPERIENCIA EN EL MODELO HDC-NITROFEN:

La MRM, desarrollada en la última década en el campo de la investigación por distintos grupos a nivel mundial, se ha aplicado tanto en estudios anatómicos de carácter malformativo en distintos modelos animales⁴¹⁹⁻⁴²³, como más recientemente, en estudios “funcionales” principalmente en el Sistema Nervioso Central y en el Corazón, mediante la obtención de imágenes avanzadas (Difusión, Perfusión y Espectroscopia) que reproducen alteraciones fisiológicas mediante la detección de cambios metabólicos ante situaciones de agresión tisular como la hipoxia o la isquemia⁴²⁴⁻⁴³⁰.

En el ámbito de las Malformaciones Congénitas, el interés de la MRM surge a partir del desarrollo de novedosos modelos animales transgénicos creados mediante técnicas de manipulación genética (*knock out*), mayoritariamente en la especie murina^{421, 431-434}. Esto creó la necesidad de examinar a multitud de animales en un tiempo asumible, lo que ha derivado en el uso progresivo de la RM como herramienta de apoyo a las tradicionales técnicas histológicas y de microdissección.

El desarrollo tecnológico ha superado incluso la resolución supracelular inicial y gracias a la aplicación de técnicas de rastreo con marcaje celular, ha sido posible obtener información “molecular” mediante la obtención de imágenes que demuestran la distribución de estas células marcadas en los tejidos, llegando así a una resolución “histológica”, equiparable o incluso superior a la obtenida mediante las técnicas histológicas actuales. Así, por ejemplo, Tyszka et al, demostraron en imágenes de MRM el recorrido del nervio óptico representado por células marcadas con Mn^{2+} , distribuidas por los microtúbulos axonales⁴²⁶.

El hecho de que la mayoría de los estudios se realicen durante la época fetal ha requerido la creación de equipos de alta potencia, de características diferentes a los utilizados en la clínica, capaces de albergar a estos animales de pequeño tamaño, y de examinar sus órganos de mínimas dimensiones. Surge así el concepto de Microrresonancia Magnética (MRM)^{430, 435}, que usa aparatos con una resolución mayor (hasta de 100 μm en animales vivos y de 20 μm en especímenes fijados) a los de la RM convencional. Un aparato de este tipo ha sido el empleado en este trabajo y previamente por otros grupos en el mismo modelo de HDC en la rata⁴³⁶.

En los experimentos más novedosos que investigan los fenómenos de mutagénesis, la modalidad de MRM “*multiembryo*” en la que se examinan varios fetos en un mismo tiempo, con imanes superconductores de mayor potencia (hasta 14T) y bovinas receptoras adaptadas, ha supuesto la máxima expresión de esta ventajosa técnica para la valoración de la expresión fenotípica de las alteraciones genéticas originadas por manipulación genética en varias generaciones de animales.^{434, 437-442}

Dada la gran ventaja de ser una técnica no invasiva, la MRM permite la investigación de una anatomía “intacta”, no manipulada y por lo tanto exenta de artefactos de conservación y sección de los especímenes, o derivados de la deshidratación y de otros tratamientos histológicos de las muestras tisulares. La MRM ha posibilitado tanto el seguimiento anatómico normal a lo largo de diferentes estadios embrionarios, como el desarrollo de malformaciones tras la creación de mutaciones letales o la administración de teratógenos, con estudios dinámicos a lo largo de la gestación mediante experimentos *in vivo*^{422, 423, 430, 443} e *in útero*,^{431, 444} en los que ha sido necesario introducir avances tecnológicos como incrementos en la potencia de magnetización, aplicación de secuencias específicas potenciadoras de la señal de los tejidos fetales, y otras ultrarrápidas con tiempos efectivos de adquisición cortos que disminuyen los artefactos de movimiento y mejoran la relación señal-ruído^{430, 431, 445}.

El estudio de ratas gestantes mediante MRM ha permitido también comprobar en este modelo experimental las consecuencias que se producen al aplicar determinadas terapias fetales, como los cambios en el diafragma, en la posición de los órganos abdominales o el crecimiento y desarrollo del parénquima pulmonar, tras la oclusión traqueal⁴³⁶.

Otro de los grandes beneficios de la RM, es la posibilidad de obtener imágenes en los distintos planos espaciales, con reconstrucciones en múltiples dimensiones (3D y 4D), que proporcionan un estudio detallado de toda la anatomía animal con una buena discriminación de relaciones anatómicas “críticas”, con una resolución superior a la de las técnicas microquirúrgicas. En este sentido por ejemplo, las reconstrucciones en 3D con proyecciones ortogonales han demostrado ser de gran utilidad en la valoración de la salida infundibular hacia la conexión con el tronco de la arteria pulmonar, región que afecta al tracto de salida del VD y que caracteriza a las malformaciones troncoconales, frecuentes en la HDC o en modelos transgénicos⁴³⁴.

Además del buen rendimiento en el examen de órganos con una disposición cameral como el corazón, y por lo tanto de sus MCV, estas reconstrucciones tridimensionales demuestran ser de gran utilidad también en el examen de los vasos, habiendo permitido en este trabajo el estudio de la anatomía venosa con gran exactitud sin la necesidad de inyección de contrastes intravenosos que hubieran dificultado considerablemente el estudio.

Estos contrastes, habitualmente empleados en la valoración del aparato cardiovascular^{419,420,431,434,436}, están constituidos por partículas de gadolinio que realzan significativamente la señal de todos los espacios vasculares, pero que conllevan también ciertos inconvenientes como la necesidad de ser inyectados a través de la canalización de los pequeños vasos umbilicales mediante procedimientos muy laboriosos, de máxima dificultad en el caso de especímenes fetales y de la manipulación del territorio venoso. Este tipo de intervenciones hubiera podido derivar en una desventaja adicional en este trabajo, al ocasionar posibles sesgos en la medición de los diámetros venosos derivados de variaciones en la presión de infusión venosa de estos líquidos en los distintos animales.

El empleo de protocolos mixtos de fijación-tinción aplicados externamente mediante inmersión de los animales, desarrollados en los últimos años^{374, 435}, obviarían estos inconvenientes, pero son poco eficaces cuando se exploran animales en estadios embrionarios avanzados por la impermeabilidad de su tegumento, como hubiera ocurrido en este caso.

En la realización de las exploraciones radiológicas se seleccionaron secuencias rápidas *espín-eco* potenciadas en T_2 que ofrecen imágenes con una señal intensa en los tejidos ricos en agua, máxima por lo tanto en el aparato cardiovascular. Este hecho, añadido a la aplicación de secuencias más rápidas a las tradicionales ha probado en este caso el gran rendimiento de la MRM en el estudio del modelo HDC-nitrofen con cortos tiempos de exploración (unos veinte minutos en cada animal).

Estas secuencias *espín-eco* son unas de las más utilizadas en RM, ya que producen un contraste entre los distintos tejidos de fácil reconocimiento, con obtención de imágenes ponderadas preferentemente en DP, T_1 y T_2 , siendo lo más habitual la formación de dos ecos tras el impulso de excitación inicial, con potenciación de la imagen en DP en el primero y en T_2 en el segundo.

Debido a la gran cantidad de fetos que obtuvimos en el grupo nitrofen (162), aquellos elegidos al azar para la realización de las exploraciones por RM, se sometieron en un primer momento a esta modalidad de secuencias *espín-eco* rápidas, pero ejecutando imágenes sólo en el plano coronal que producían un “barrido” de la región toracoabdominal en pocos segundos, que confirmaba o descartaba la existencia de un defecto diafragmático. Sólo en aquellos animales en los que se diagnosticó la existencia de HDC, se continuaron los exámenes radiológicos más complejos, evitando así exploraciones innecesarias en fetos del grupo nitrofen sin hernia, no incluidos por lo tanto en este estudio.

Para la interpretación de las imágenes y la valoración de las distintas estructuras embrionarias se tomó como referencia el atlas radiológico embrionario de la especie murina de *Petiet*³⁷² que trata de forma detallada la anatomía murina con imágenes por RM en 4 dimensiones, desde el estadio embrionario E10.5 hasta la época postnatal.

El avance en las tecnologías digitales ha proporcionado el desarrollo de una nueva generación de atlas interactivos^{372, 446} en los que, mediante links de conexión con las distintas láminas anatómicas, el observador puede “seccionar” el espécimen digital en cualquier plano y ángulo para el examen de cualquier estructura. A parte del estudio anatómico convencional, la información que ofrecen estos atlas alcanza niveles ultraestructurales o moleculares, ofreciendo incluso información genética en forma de “mapas” de distribución de la expresión génica en distintos órganos, como por ejemplo la de los genes *Homebox* en el SNC⁴⁴⁶.

Nuestros resultados avalan la gran utilidad y rendimiento de la Micro-RM en el estudio anatómico de las venas de estos pequeños animales, que al igual que en el resto del aparato cardiovascular, se ha conseguido gracias a la utilización de un campo magnético muy potente (7T), que disminuye artefactos de movimiento, mejorando considerablemente la ratio señal-ruido y con ello la resolución de las imágenes.

Ha hecho posible una valoración cuantitativa mediante la medición de las dimensiones y espesores de los distintos componentes cardíacos (válvulas cardíacas, septos auriculares y ventriculares; ductus arterioso y venas pulmonares y sistémicas) y la de los diámetros venosos de las principales venas cervicotorácicas, objetivo primordial de este apartado.

Además, las imágenes obtenidas según los planos sagital, coronal y axial mediante la aplicación de las secuencias *espín-eco* anteriormente descritas, ofrecieron un mapa anatómico muy detallado de las regiones cervical, torácica y abdominal que hicieron posible, junto a la elevada potencia de magnetización, una fácil y certera interpretación de las distintas estructuras anatómicas de todos los animales en tejido sin manipular ni fijar.

En efecto, se alcanzó una adecuada resolución sin la necesidad de la fijación de los fetos en soluciones de agarosa y formol, metodología habitualmente descrita en los estudios publicados hasta el momento^{374, 431, 434, 436, 443}. Esto evitó la manipulación de los especímenes y la aparición de errores en la interpretación radiológica producidos por la variación de los planos exactos de exploración debido a los movimientos que pudiesen manifestar los fetos “embebidos” en este tipo de soluciones.

No obstante, a pesar del buen rendimiento obtenido en el estudio del aparato cardiovascular y más específicamente, del sistema venoso con Micro-RM, y haber probado su eficacia con la obtención de resultados significativos que dan respuesta a nuestra hipótesis sobre las anomalías venosas en este modelo experimental, no debemos olvidar ciertos inconvenientes de la MRM como son los largos tiempos de exploración y la necesidad de personal técnico cualificado, que incrementan de forma considerable el coste de este tipo de experimentos.

Dicho coste se ha visto reducido en los últimos años gracias a los avances metodológicos anteriormente citados respecto al desarrollo de secuencias ultrarrápidas e imanes muy potentes, que han permitido reducir los prolongados tiempos de exploración iniciales con menos artefactos de imagen (en torno a las 24h hace una década, a los pocos minutos requeridos en la actualidad)^{374, 433, 443}.

De hecho, tanto en las exploraciones de los órganos torácicos y abdominales examinados, como en las del sistema venoso, se obtuvieron imágenes de alta resolución (>200 DPI) utilizando campos de visión relativamente pequeños (22x 22mm) que exploraban áreas anatómicas muy selectivas con la consiguiente potenciación de la resolución y facilitación de las medidas venosas en pocos minutos.

Por último, sugerimos que investigaciones similares sobre la disposición y tamaño del sistema venoso en pacientes supervivientes con HDC, serían interesantes y necesarias para confirmar una vez más el paralelismo malformativo entre los modelos humano y experimental en esta enfermedad,.

3.4. METODOLOGÍA UTILIZADA. LIMITACIONES:

En cuanto a la metodología seguida en la valoración y análisis de las medidas venosas obtenidas en las imágenes por RM, es imprescindible tener en cuenta la discrepancia en el tamaño de los fetos con HDC y los controles, lo que imposibilita la comparación de los diámetros venosos en valores absolutos, influenciados inevitablemente por el tamaño de los animales.

Esto hace necesario introducir una medida de corrección que relativice las distintas medidas y permita la comparación entre ambos grupos. Así, se estudió el peso fetal y otras referencias corporales como la altura de la tercera vértebra cervical (C3), la longitud de la columna cervical desde C3 a C7, el diámetro transversal cardíaco (a nivel del tracto de salida de ambos ventrículos) y de la aorta descendente proximal y la distancia comprendida entre la superficie superior de T3 y la inferior de T5 según el plano axial.

Se descartaron la medida de C3 y el diámetro aórtico, por ser mayores en los animales con HDC por lo que tamaños venosos menores relacionados con estructuras más grandes, resultarían distorsionadamente pequeños en este grupo, pudiendo caer en el error de obtener diferencias anormalmente elevadas entre ambos grupos.

La medida de los diámetros aórtico y cardíaco no resultaba totalmente objetiva al poder existir pequeñas variaciones en el nivel anatómico en el que se medían en los distintos animales, por lo que se desestimaron como valores de referencia.

Por el contrario, la distancias C3-C7 y T3-T5, eran mayores en los controles que en los fetos con HDC, mostrando la misma tendencia que el tamaño fetal y el tamaño venoso, aunque con mayor correlación con el peso corporal en el caso de la referencia vertebral torácica, finalmente seleccionada.

Aunque en el análisis comparativo de los tamaños venosos se encontraron diferencias estadísticamente significativas tomando como referencia cualquiera de las anteriormente descritas; se decidió tomar la distancia axial T3-T5, como medida a relacionar con el diámetro venoso absoluto en cada caso. Este valor constituía una medida fiable y reproducible en todos los animales, guardaba la mejor correlación con el peso corporal, era fácilmente identificable sin artefactos asociados, y por lo tanto, objetivamente medible en todas las exploraciones en el mismo plano espacial.

Esta arbitrariedad en la elección de las estructuras anatómicas a tomar como referencia para la relativización de los diámetros venosos, es la principal limitación metodológica de nuestro trabajo. De ahí nuestro interés en redefinir en futuros experimentos otros parámetros de medida que confirmen los resultados obtenidos.

Al no existir publicaciones de esta índole en este modelo animal no se han podido establecer comparaciones a este respecto. Y es que el elevado coste de estos equipos de RM de alta potencia, disponibles sólo en grandes centros médicos o en pioneros centros de investigación (CSIC en nuestro caso), junto a la necesidad de profesionales expertos y tiempos de exploración aún prolongados en muchas situaciones, han favorecido la escasez de experimentos de este tipo, impidiendo la comparación y homogeneización de resultados entre investigaciones del mismo tipo con los mismos criterios metodológicos que permitan validar conclusiones por los distintos grupos científicos.

CONCLUSIONES

1.- Este trabajo demuestra la existencia de nuevos componentes de disfunción neurocristal en la hernia diafragmática congénita, tanto en el humano, como en el modelo animal de la malformación, que sustentan la hipótesis de la existencia de alteraciones en los mecanismos reguladores de la organogénesis vehiculados por la CN, en la patogenia de la HDC y de sus malformaciones asociadas.

2.- Así, se observaron en las necropsias de los pacientes fallecidos por HDC, alteraciones histológicas tiroideas consistentes en una disminución en la proporción de las células C productoras de calcitonina (CC) en ellos. Estos hallazgos son similares a las alteraciones demostradas en los animales con HDC, evidenciándose una vez más el paralelismo existente entre el modelo animal y el complejo malformativo humano.

3.- Sin embargo, no se han detectado entre nuestros pacientes alteraciones significativas del metabolismo fosfocálcico. Esto hace suponer un correcto funcionamiento de las glándulas tiroides y paratiroides, sin poder demostrar repercusiones clínicas ni analíticas que traduzcan anomalías de las CC o de las glándulas paratiroides, que sí están presentes en el modelo animal de HDC.

4.- Aunque no se encontraron aparentes alteraciones funcionales de las CC o de las glándulas paratiroides, se detectó una elevada proporción de pacientes con defectos de masa ósea a pesar de una homeostasis fosfocálcica normal. Algunos de ellos tenían factores de riesgo clínicos, antropométricos y nutricionales; pero otros quedan sin explicación, lo que requiere estudios futuros en poblaciones más amplias.

5.- El estudio del fenotipado linfocitario reveló una disminución significativa y subclínica de los linfocitos T citotóxicos “memoria” (CD8Ro) en nuestros pacientes menores de 2 años, en comparación con sus controles; siendo normales las demás subpoblaciones linfocitarias. El carácter aislado y sin repercusiones clínicas de estas alteraciones en una población pequeña de pacientes, no confirma la hipótesis de que existan alteraciones anatómicas subyacentes del timo, equivalentes a las descritas en animales con HDC.

6.- Finalmente, este trabajo demuestra mediante estudios anatómicos con Micro-Resonancia Magnética en el modelo de rata con HDC, que existen alteraciones del sistema venoso sistémico, consistentes en una disminución significativa del tamaño de las principales venas de la región cervicotorácica. Como las venas mayores se desarrollan también bajo control por la CN, estas anomalías se suman a las cardíacas y arteriales previamente demostradas como prueba de la disfunción neurocristal en este proceso.

BIBLIOGRAFIA

1. Smith NP, Jesudason EC, Losty PD: Congenital diaphragmatic hernia. *Paediatric respiratory reviews* 3:339-348, 2002
2. Holder AM, Klaassens M, Tibboel D, et al: Genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet* 80:825-845, 2007
3. Wright JC, Budd JL, Field DJ, et al: Epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 9-year experience. *Paediatr Perinat Epidemiol* 25:144-149, 2011
4. Skari H, Bjornland K, Haugen G, et al: Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 35:1187-1197, 2000
5. Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, et al: The tracheobronchial tree is abnormal in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 15:184-187, 1999
6. Clark RH, Hardin WD, Jr., Hirschl RB, et al: Current surgical management of congenital diaphragmatic hernia: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. *J Pediatr Surg* 33:1004-1009, 1998
7. Desfrere L, Jarreau PH, Dommergues M, et al: Impact of delayed repair and elective high-frequency oscillatory ventilation on survival of antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia: first application of these strategies in the more "severe" subgroup of antenatally diagnosed newborns. *Intensive Care Med* 26:934-941, 2000
8. Luis AL, Avila LF, Encinas JL, et al: Results of the treatment of congenital diaphragmatic hernia with conventional therapeutic modalities. *Cir Pediatr* 19:167-172, 2006
9. Stege G, Fenton A, Jaffray B: Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 112:532-535, 2003
10. Fauza DO, Wilson JM: Congenital diaphragmatic hernia and associated anomalies: their incidence, identification, and impact on prognosis. *J Pediatr Surg* 29:1113-1117, 1994
11. Tibboel D, Gaag AV: Etiologic and genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Clinics in perinatology* 23:689-699, 1996
12. Migliazza L, Otten C, Xia H, et al: Cardiovascular malformations in congenital diaphragmatic hernia: human and experimental studies. *J Pediatr Surg* 34:1352-1358, 1999
13. Migliazza L, Xia H, Alvarez JL, et al: Heart hypoplasia in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 34:706-710, 1999
14. Yu J, Gonzalez S, Rodriguez JL, et al: Neural crest-derived defects in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 17:294-298, 2001
15. Slavotinek AM: Fryns syndrome: a review of the phenotype and diagnostic guidelines. *Am J Med Genet A* 124A:427-433, 2004
16. Slavotinek A, Lee SS, Davis R, et al: Fryns syndrome phenotype caused by chromosome microdeletions at 15q26.2 and 8p23.1. *J Med Genet* 42:730-736, 2005
17. Chen CP, Lee CC, Pan CW, et al: Partial trisomy 8q and partial monosomy 15q associated with congenital hydrocephalus, diaphragmatic hernia, urinary tract anomalies, congenital heart defect and kyphoscoliosis. *Prenat Diagn* 18:1289-1293, 1998
18. Kim EH, Cohen RS, Ramachandran P, et al: Trisomy 22 with congenital diaphragmatic hernia and absence of corpus callosum in a liveborn premature infant. *Am J Med Genet* 44:437-438, 1992
19. Ladonne JM, Gaillard D, Carre-Pigeon F, et al: Fryns syndrome phenotype and trisomy 22. *Am J Med Genet* 61:68-70, 1996
20. Iritani I: Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl)* 169:133-139, 1984
21. Puri P, Wester T: Historical aspects of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 12:95-100, 1997
22. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B: Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 53:726-730, 2003
23. Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, et al: Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120:2749-2771, 1994

24. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, et al: Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:475-486, 1995
25. Major D, Cadenas M, Fournier L, et al: Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 13:547-549, 1998
26. Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Calonge WM, et al: Vitamin A improves Pax3 expression that is decreased in the heart of rats with experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 41:327-330, 2006
27. Kling DE, Schnitzer JJ: Vitamin A deficiency (VAD), teratogenic, and surgical models of congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145:139-157, 2007
28. Yu J, Gonzalez S, Diez-Pardo JA, et al: Effects of vitamin A on malformations of neural-crest-controlled organs induced by nitrofen in rats. *Pediatr Surg Int* 18:600-605, 2002
29. Bryner BS, Kim AC, Khouri JS, et al: Right-sided congenital diaphragmatic hernia: high utilization of extracorporeal membrane oxygenation and high survival. *J Pediatr Surg* 44:883-887, 2009
30. Fisher JC, Jefferson RA, Arkovitz MS, et al: Redefining outcomes in right congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 43:373-379, 2008
31. Daher P, Zeidan S, Azar E, et al: Right congenital diaphragmatic hernia a well-known pathology? *Pediatr Surg Int* 19:293-295, 2003
32. Moore KLP, T.V.N: *Embriología Clínica*. Madrid, España, Elsevier, 2004
33. Andersen DH: Incidence of congenital diaphragmatic hernia in the young of rats bred on a diet deficient in vitamin A. *Am J Dis Child*:62:888, 1941
34. Andersen DH: Effect of diet during pregnancy upon the incidence of congenital hereditary diaphragmatic hernia in the rat; failure to produce cystic fibrosis of the pancreas by maternal vitamin A deficiency. *Am J Pathol* 25:163-185, 1949
35. Kavlock RJ, Gray LE, Jr.: Postnatal evaluation of morphological and functional effects of prenatal exposure to nitrofen in the Long-Evans rat. *J Toxicol Environ Health* 11:679-690, 1983
36. Allan DW, Greer JJ: Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol* 83:338-347, 1997
37. Babiuk RP, Zhang W, Clugston R, et al: Embryological origins and development of the rat diaphragm. *J Comp Neurol* 455:477-487, 2003
38. Clugston RD, Klattig J, Englert C, et al: Teratogen-induced, dietary and genetic models of congenital diaphragmatic hernia share a common mechanism of pathogenesis. *Am J Pathol* 169:1541-1549, 2006
39. Keijzer R, Liu J, Deimling J, et al: Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 156:1299-1306, 2000
40. Migliazza L, Xia H, Diez-Pardo JA, et al: Skeletal malformations associated with congenital diaphragmatic hernia: experimental and human studies. *J Pediatr Surg* 34:1624-1629, 1999
41. Yu J, Gonzalez S, Martinez L, et al: Effects of retinoic acid on the neural crest-controlled organs of fetal rats. *Pediatr Surg Int* 19:355-358, 2003
42. Martinez-Frias ML, Prieto L, Urioste M, et al: Clinical/epidemiological analysis of congenital anomalies associated with diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 62:71-76, 1996
43. Tovar JA: Stephen L. Gans Distinguished Overseas Lecture. The neural crest in pediatric surgery. *J Pediatr Surg* 42:915-926, 2007
44. Gallot D, Marceau G, Coste K, et al: Congenital diaphragmatic hernia: a retinoid-signaling pathway disruption during lung development? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:523-531, 2005
45. Warkany J, Roth CB, Wilson JG: Multiple congenital malformations; a consideration of etiologic factors. *Pediatrics* 1:462-471, 1948
46. Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, et al: Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol* 277:L423-429, 1999
47. Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Tovar JA: Effects of prenatal vitamins A, E, and C on the hypoplastic hearts of fetal rats with diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 40:1269-1274, 2005
48. Nakazawa N, Montedonico S, Takayasu H, et al: Disturbance of retinol transportation causes nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 42:345-349, 2007
49. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, et al: Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723-2748, 1994

50. Noble BR, Babiuk RP, Clugston RD, et al: Mechanisms of action of the congenital diaphragmatic hernia-inducing teratogen nitrofen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1079-1087, 2007
51. Nakazawa N, Takayasu H, Montedonico S, et al: Altered regulation of retinoic acid synthesis in nitrofen-induced hypoplastic lung. *Pediatr Surg Int* 23:391-396, 2007
52. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, et al: Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol* 162:673-679, 2003
53. Chen MH, MacGowan A, Ward S, et al: The activation of the retinoic acid response element is inhibited in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Biol Neonate* 83:157-161, 2003
54. Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, et al: Early lung malformations in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 35:124-127, 2000
55. Montedonico S, Nakazawa N, Puri P: Retinoic acid rescues lung hypoplasia in nitrofen-induced hypoplastic foetal rat lung explants. *Pediatr Surg Int* 22:2-8, 2006
56. Beurskens LW, Tibboel D, Lindemans J, et al: Retinol status of newborn infants is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 126:712-720, 2010
57. Thompson SM, Jesudason EC, Turnbull JE, et al: Heparan sulfate in lung morphogenesis: The elephant in the room. *Birth defects research Part C*, 90:32-44, 2010
58. Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, et al: In vitro effects of growth factors on lung hypoplasia in a model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 35:914-922, 2000
59. Jesudason EC: Challenging embryological theories on congenital diaphragmatic hernia: future therapeutic implications for paediatric surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 84:252-259, 2002
60. Mark M, Rijli FM, Chambon P: Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 42:421-429, 1997
61. Patel NH, Prince VE: Beyond the Hox complex. *Genome Biol* 1:REVIEW51027, 2000
62. Trainor PA, Krumlauf R: Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr Opin Cell Biol* 13:698-705, 2001
63. Manley NR, Capecchi MR: The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* 121:1989-2003, 1995
64. Manley NR, Capecchi MR: Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* 195:1-15, 1998
65. Fu M, Lui VC, Sham MH, et al: HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev Dyn* 228:1-10, 2003
66. Klaassens M, de Klein A, Tibboel D: The etiology of congenital diaphragmatic hernia: still largely unknown? *Eur J Med Genet* 52:281-286, 2009
67. Kim C, Nielsen HC: Hoxa-5 in mouse developing lung: cell-specific expression and retinoic acid regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L863-871, 2000
68. Puri P, Gorman F: Lethal nonpulmonary anomalies associated with congenital diaphragmatic hernia: implications for early intrauterine surgery. *J Pediatr Surg* 19:29-32, 1984
69. Sweed Y, Puri P: Congenital diaphragmatic hernia: influence of associated malformations on survival. *Arch Dis Child* 69:68-70, 1993
70. Harrison MR, Bjordal RI, Langmark F, et al: Congenital diaphragmatic hernia: the hidden mortality. *J Pediatr Surg* 13:227-230, 1978
71. Kantarci S, Casavant D, Prada C, et al: Findings from aCGH in patients with congenital diaphragmatic hernia (CDH): a possible locus for Fryns syndrome. *Am J Med Genet Part A* 140:17-23, 2006
72. Enns GM, Cox VA, Goldstein RB, et al: Congenital diaphragmatic defects and associated syndromes, malformations, and chromosome anomalies: a retrospective study of 60 patients and literature review. *Am J Med Genet* 79:215-225, 1998
73. Klaassens M, Galjaard RJ, Scott DA, et al: Prenatal detection and outcome of congenital diaphragmatic hernia (CDH) associated with deletion of chromosome 15q26: two patients and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 143A:2204-2212, 2007
74. Fasching G, Huber A, Uray E, et al: Gastroesophageal reflux and diaphragmatic motility after repair of congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 10:360-364, 2000

75. Koot VC, Bergmeijer JH, Bos AP, et al: Incidence and management of gastroesophageal reflux after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 28:48-52, 1993
76. Stolar CJ, Levy JP, Dillon PW, et al: Anatomic and functional abnormalities of the esophagus in infants surviving congenital diaphragmatic hernia. *Am J Surg* 159:204-207, 1990
77. Vanamo K, Rintala RJ, Lindahl H, et al: Long-term gastrointestinal morbidity in patients with congenital diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 31:551-554, 1996
78. Tovar JA, Luis AL, Encinas JL, et al: Pediatric surgeons and gastroesophageal reflux. *J Pediatr Surg* 42:277-283, 2007
79. Arena F, Romeo C, Baldari S, et al: Gastrointestinal sequelae in survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Int* 50:76-80, 2008
80. Martinez L, Aras-Lopez R, Lancha S, et al: Abnormal development of the enteric nervous system in rat embryos and fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 27:165-173, 2011
81. Pederiva F, Rodriguez JI, Ruiz-Bravo E, et al: Abnormal intrinsic esophageal innervation in congenital diaphragmatic hernia: a likely cause of motor dysfunction. *J Pediatr Surg* 44:496-499, 2009
82. Stevens TP, Chess PR, McConnochie KM, et al: Survival in early- and late-term infants with congenital diaphragmatic hernia treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatrics* 110:590-596, 2002
83. Downard CD, Wilson JM: Current therapy of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Neonatol* 8:215-221, 2003
84. Lally KP, Bagolan P, Hosie S, et al: Corticosteroids for fetuses with congenital diaphragmatic hernia: can we show benefit? *J Pediatr Surg* 41:668-674, 2006
85. Clark RH, Gerstmann DR, Jobe AH, et al: Lung injury in neonates: causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *J Pediatr* 139:478-486, 2001
86. Wung JT, Sahni R, Moffitt ST, et al: Congenital diaphragmatic hernia: survival treated with very delayed surgery, spontaneous respiration, and no chest tube. *J Pediatr Surg* 30:406-409, 1995
87. Logan JW, Cotten CM, Goldberg RN, et al: Mechanical ventilation strategies in the management of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 16:115-125, 2007
88. Boloker J, Bateman DA, Wung JT, et al: Congenital diaphragmatic hernia in 120 infants treated consecutively with permissive hypercapnea/spontaneous respiration/elective repair. *J Pediatr Surg* 37:357-366, 2002
89. Frenckner B, Ehren H, Granholm T, et al: Improved results in patients who have congenital diaphragmatic hernia using preoperative stabilization, extracorporeal membrane oxygenation, and delayed surgery. *J Pediatr Surg* 32:1185-1189, 1997
90. Tovar JA: Congenital diaphragmatic hernia. *Orphanet J Rare Dis* 7:1, 2012
91. Hardesty RL, Griffith BP, Debski RF, et al: Extracorporeal membrane oxygenation. Successful treatment of persistent fetal circulation following repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 81:556-563, 1981
92. Heiss K, Manning P, Oldham KT, et al: Reversal of mortality for congenital diaphragmatic hernia with ECMO. *Ann Surg* 209:225-230, 1989
93. Nagaya M, Tsuda M, Murahashi O, et al: Management of congenital diaphragmatic hernia by extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Eur J Pediatr Surg* 1:10-14, 1991
94. Wilson JM, Lund DP, Lillehei CW, et al: Congenital diaphragmatic hernia: predictors of severity in the ECMO era. *J Pediatr Surg* 26:1028-1033, 1991
95. Kattan J, Godoy L, Zavala A, et al: Improvement of survival in infants with congenital diaphragmatic hernia in recent years: effect of ECMO availability and associated factors. *Pediatr Surg Int* 26:671-676, 2010
96. Ssemakula N, Stewart DL, Goldsmith LJ, et al: Survival of patients with congenital diaphragmatic hernia during the ECMO era: an 11-year experience. *J Pediatr Surg* 32:1683-1689, 1997
97. Nagaya M, Kato J, Niimi N, et al: Analysis of patients with congenital diaphragmatic hernia requiring pre-operative extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Pediatr Surg Int* 14:25-29, 1998
98. Glick PL, Stannard VA, Leach CL, et al: Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia II: the fetal lamb CDH model is surfactant deficient. *J Pediatr Surg* 27:382-387, 1992
99. Mysore MR, Margraf LR, Jaramillo MA, et al: Surfactant protein A is decreased in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 157:654-657, 1998

100. Colby CE, Lally KP, Hintz SR, et al: Surfactant replacement therapy on ECMO does not improve outcome in neonates with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 39:1632-1637, 2004
101. Janssen DJ, Tibboel D, Carnielli VP, et al: Surfactant phosphatidylcholine pool size in human neonates with congenital diaphragmatic hernia requiring ECMO. *J Pediatr* 142:247-252, 2003
102. Gasior AC, St Peter SD: A review of patch options in the repair of congenital diaphragm defects. *Pediatr Surg Int* , 28:327-33, 2012
103. Clark RH, Hardin WD, Jr., Hirschl RB, et al: Current surgical management of congenital diaphragmatic hernia: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. *J Pediatr Surg* 33:1004-1009, 1998
104. Barrena S, Avila LF, Aguilar R, et al: Morbidity and mortality associated with prosthetic patch in congenital diaphragmatic hernia. *Cir Pediatr* 21:157-161, 2008
105. Bekdash B, Singh B, Lakhoo K: Recurrent late complications following congenital diaphragmatic hernia repair with prosthetic patches: a case series. *J Med Case Reports* 3:7237, 2009
106. Bianchi A, Doig CM, Cohen SJ: The reverse latissimus dorsi flap for congenital diaphragmatic hernia repair. *J Pediatr Surg* 18:560-563, 1983
107. Nasr A, Struijs MC, Ein SH, et al: Outcomes after muscle flap vs prosthetic patch repair for large congenital diaphragmatic hernias. *J Pediatr Surg* 45:151-154, 2010
108. Liem NT, Nhat LQ, Tuan TM, et al: Thoracoscopic repair for congenital diaphragmatic hernia: experience with 139 cases. *J Lap Adv Surg Tech Part A* 21:267-270, 2011
109. Shah SR, Wishnew J, Barsness K, et al: Minimally invasive congenital diaphragmatic hernia repair: a 7-year review of one institution's experience. *Surg End* 23:1265-1271, 2009
110. Lipshutz GS, Albanese CT, Feldstein VA, et al: Prospective analysis of lung-to-head ratio predicts survival for patients with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 32:1634-1636, 1997
111. Jani JC, Benachi A, Nicolaides KH, et al: Prenatal prediction of neonatal morbidity in survivors with congenital diaphragmatic hernia: a multicenter study. *Ultras Obst Gynecol*33:64-69, 2009
112. Harrison MR, Adzick NS, Bullard KM, et al: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero VII: a prospective trial. *J Pediatr Surg* 32:1637-1642, 1997
113. Harrison MR, Adzick NS, Flake AWW, et al: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero: VI. Hard-earned lessons. *J Pediatr Surg* 28:1411-1417, 1993
114. Harrison MR, Bressack MA, Churg AM, et al: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. II. Simulated correction permits fetal lung growth with survival at birth. *Surgery* 88:260-268, 1980
115. Bealer JF, Skarsgard ED, Hedrick MH, et al: The 'PLUG' odyssey: adventures in experimental fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 30:361-364, 1995
116. Luks FI, Gilchrist BF, Jackson BT, et al: Endoscopic tracheal obstruction with an expanding device in a fetal lamb model: preliminary considerations. *Fet Diag Ther* 11:67-71, 1996
117. Skarsgard ED, Meuli M, VanderWall KJ, et al: Fetal endoscopic tracheal occlusion ('Fetendo-PLUG') for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 31:1335-1338, 1996
118. VanderWall KJ, Skarsgard ED, Filly RA, et al: Fetendo-clip: a fetal endoscopic tracheal clip procedure in a human fetus. *J Pediatr Surg* 32:970-972, 1997
119. van Loenhout RB, Tibboel D, Post M, et al: Congenital diaphragmatic hernia: comparison of animal models and relevance to the human situation. *Neonatology* 96:137-149, 2009
120. Jelin EB, Etemadi M, Encinas J, et al: Dynamic tracheal occlusion improves lung morphometrics and function in the fetal lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 46:1150-1157, 2011
121. Deprest J, Jani J, Van Schoubroeck D, et al: Current consequences of Prenat Diagof congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 41:423-430, 2006
122. Muensterer OJ, Nicola T, Farmer S, et al: Temporary fetal tracheal occlusion using a gel plug in a rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 47:1063-1066, 2012
123. Shue EH, Miniati D, Lee H: Advances in Prenat Diagand treatment of congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinat* 39:289-300, 2012
124. Kamata S, Usui N, Kamiyama M, et al: Long-term follow-up of patients with high-risk congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 40:1833-1838, 2005
125. Lally KP, Engle W: Postdischarge follow-up of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 121:627-632, 2008

126. Peetsold MG, Heij HA, Kneepkens CM, et al: The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: a broad spectrum of morbidity. *Pediatr Surg Int* 25:1-17, 2009
127. Muratore CS, Kharasch V, Lund DP, et al: Pulmonary morbidity in 100 survivors of congenital diaphragmatic hernia monitored in a multidisciplinary clinic. *J Pediatr Surg* 36:133-140, 2001
128. Vanamo K, Rintala R, Sovijarvi A, et al: Long-term pulmonary sequelae in survivors of congenital diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 31:1096-1099, 1996
129. van den Hout L, Sluiter I, Gischler S, et al: Can we improve outcome of congenital diaphragmatic hernia? *Pediatr Surg Int* 25:733-743, 2009
130. Ijsselstijn H, Tibboel D, Hop WJ, et al: Long-term pulmonary sequelae in children with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 155:174-180, 1997
131. Pederiva F, Lopez RA, Rodriguez JI, et al: Bronchopulmonary innervation defects in infants and rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 45:360-365, 2010
132. Van Meurs KP, Robbins ST, Reed VL, et al: Congenital diaphragmatic hernia: long-term outcome in neonates treated with extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr* 122:893-899, 1993
133. Muratore CS, Utter S, Jaksic T, et al: Nutritional morbidity in survivors of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36:1171-1176, 2001
134. Bernbaum J, Schwartz IP, Gerdes M, et al: Survivors of extracorporeal membrane oxygenation at 1 year of age: the relationship of primary diagnosis with health and neurodevelopmental sequelae. *Pediatrics* 96:907-913, 1995
135. Bouman NH, Koot HM, Tibboel D, et al: Children with congenital diaphragmatic hernia are at risk for lower levels of cognitive functioning and increased emotional and behavioral problems. *Eur J Pediatr Surg* 10:3-7, 2000
136. Davenport M, Rivlin E, D'Souza SW, et al: Delayed surgery for congenital diaphragmatic hernia: neurodevelopmental outcome in later childhood. *Arch Dis Child* 67:1353-1356, 1992
137. Frisk V, Jakobson LS, Unger S, et al: Long-term neurodevelopmental outcomes of congenital diaphragmatic hernia survivors not treated with extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 46:1309-1318, 2011
138. Nobuhara KK, Lund DP, Mitchell J, et al: Long-term outlook for survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinat* 23:873-887, 1996
139. Morini F, Capolupo I, Masi R, et al: Hearing impairment in congenital diaphragmatic hernia: the inaudible and noiseless foot of time. *J Pediatr Surg* 43:380-384, 2008
140. Vanamo K, Peltonen J, Rintala R, et al: Chest wall and spinal deformities in adults with congenital diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 31:851-854, 1996
141. Alfonso LF, Vilanova J, Aldazabal P, et al: Lung growth and maturation in the rat model of experimentally induced congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 3:6-11, 1993
142. Costlow RD, Hirsekorn JM, Stiratelli RG, et al: The effects on rat pups when nitrofen (4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrobenzene) was applied dermally to the dam during organogenesis. *Toxicology* 28:37-50, 1983
143. Manson JM, Brown T, Baldwin DM: Teratogenicity of nitrofen (2,4-dichloro-4'-nitrodiphenyl ether) and its effects on thyroid function in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 73:323-335, 1984
144. Costlow RD, Manson JM: The heart and diaphragm: target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). *Toxicology* 20:209-227, 1981
145. Greer JJ, Allan DW, Babiuk RP, et al: Recent advances in understanding the pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 29:394-399, 2000
146. Losty PD, Connell MG, Freese R, et al: Cardiovascular malformations in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 34:1203-1207, 1999
147. Yu J, Gonzalez S, Diez-Pardo JA, et al: Effects of early embryonal exposure to dexamethasone on malformations of neural-crest derivatives induced by nitrofen in rats. *Pediatr Surg Int* 18:606-610, 2002
148. Kluth D, Tenbrinck R, von Ekesparre M, et al: The natural history of congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia in the embryo. *J Pediatr Surg* 28:456-462, 1993
149. Guilbert TW, Gebb SA, Shannon JM: Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1159-1171, 2000
150. Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Martinez-Calonge W, et al: Effects of nitrofen and vitamins A, C and E on maturation of cultured human H461 pneumocytes. *Biol Neonat* 90:9-16, 2006

151. van Loenhout RB, Tseu I, Fox EK, et al: The pulmonary mesenchymal tissue layer is defective in an in vitro recombinant model of nitrofen-induced lung hypoplasia. *Am J Pathol* 180:48-60, 2012
152. Teramoto H, Yoneda A, Puri P: Gene expression of fibroblast growth factors 10 and 7 is downregulated in the lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 38:1021-1024, 2003
153. Brandsma AE, ten Have-Opbroek AA, Vulto IM, et al: Alveolar epithelial composition and architecture of the late fetal pulmonary acinus: an immunocytochemical and morphometric study in a rat model of pulmonary hypoplasia and congenital diaphragmatic hernia. *Exp Lung Res* 20:491-515, 1994
154. Takayasu H, Nakazawa N, Montedonico S, et al: Impaired alveolar epithelial cell differentiation in the hypoplastic lung in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 23:405-410, 2007
155. Brandsma AE, Tibboel D, Vulto IM, et al: Inhibition of T3-receptor binding by Nitrofen. *Bioch Biophys Acta* 1201:266-270, 1994
156. Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Tovar JA: Vitamin C rescues in part the effects of nitrofen on cultured human pneumocytes. *Pediatr Surg Int* 20:258-262, 2004
157. Noble BR, Babiuk RP, Clugston RD, et al: Mechanisms of action of the congenital diaphragmatic hernia-inducing teratogen nitrofen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1079-L1087, 2007
158. Kim WG, Suh JW, Chi JG: Nitrofen-induced congenital malformations of the heart and great vessels in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 34:1782-1786, 1999
159. Martinez L, De Ceano-Vivas M, Gonzalez-Reyes S, et al: Thyroid C cells are decreased in experimental CDH. *Cir Pediatr* 19:101-105, 2006
160. Martinez L, Gonzalez-Reyes S, Burgos E, et al: The vagus and recurrent laryngeal nerves in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 20:253-257, 2004
161. Pederiva F, Lopez RA, Martinez L, et al: Tracheal innervation is abnormal in rats with experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 44:1159-1164, 2009
162. Martinez L, Ceano-Vivas MD, Gonzalez-Reyes S, et al: Decrease of parafollicular thyroid C-cells in experimental esophageal atresia: further evidence of a neural crest pathogenic pathway. *Pediatr Surg Int* 21:175-179, 2005
163. Palacios J, Gamallo C, Garcia M, et al: Decrease in thyrocalcitonin-containing cells and analysis of other congenital anomalies in 11 patients with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet* 46:641-646, 1993
164. Aidlen JT, Nazarey PP, Kinane TB, et al: Retinoic acid-mediated differentiation protects against nitrofen-induced apoptosis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80:406-416, 2007
165. Kling DE, Aidlen JT, Fisher JC, et al: Nitrofen induces a redox-dependent apoptosis associated with increased p38 activity in P19 teratocarcinoma cells. *Toxicol Vitro* 19:1-10, 2005
166. Kling DE, Cavicchio AJ, Sollinger CA, et al: Nitrofen induces apoptosis independently of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) inhibition. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 89:223-232, 2010
167. Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, et al: Cell proliferation and apoptosis in experimental lung hypoplasia. *J Pediatr Surg* 35:129-133, 2000
168. Warkany J: Disturbance of embryonic development by maternal vitamin deficiencies. *J Cell Physiol Suppl* 43:207-236, 1954
169. Babiuk RP, Thebaud B, Greer JJ: Reductions in the incidence of nitrofen-induced diaphragmatic hernia by vitamin A and retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L970-973, 2004
170. Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, et al: Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type I alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 43:367-372, 2008
171. Montedonico S, Sugimoto K, Felle P, et al: Prenatal treatment with retinoic acid promotes pulmonary alveologenesis in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 43:500-507, 2008
172. Clugston RD, Zhang W, Alvarez S, et al: Understanding abnormal retinoid signaling as a causative mechanism in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Resp Cell Mol Biol* 42:276-285, 2010
173. Gans C, Northcutt RG: Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science* 220:268-273, 1983
174. Hall BK: The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci* 33:781-793, 2008
175. Donoghue PC, Graham A, Kelsh RN: The origin and evolution of the neural crest. *Bioessays* 30:530-541, 2008

176. Hall BK: The neural crest in development and evolution. New York, USA, Springer-Verlag, 1999
177. Landacre F: The fate of the neural crest in the head of the urodeles. *J Comp Neurol* 6:1-43, 1921
178. Stone LS: Experiments showing the role of migrating neural crest (mesectoderm) in the formation of head skeleton and loose connective tissue in *Rana palustris*. *Dev Genes Evol* 118:40-77, 1926
179. Le Lièvre CSLD, N.M.: Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morph* 34:125-154, 1975
180. Noden DM: The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. *Dev Biol* 67:296-312, 1978
181. Weston JA: The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphog* 8:41-114, 1970
182. Carlson BM: Human Embriology and Dev Biol, Mosby, Elsevier, 2009
183. Morriss-Kay GT, S.S.: Mapping cranial neural crest cell migration pathways in mammalian embryos. *Trends Genet* 3:257-261, 1987
184. Bronner-Fraser M: Origins and developmental potential of the neural crest. *Exp Cell Res* 218:405-417, 1995
185. Kuratani S: Spatial distribution of postotic crest cells defines the head/trunk interface of the vertebrate body: embryological interpretation of peripheral nerve morphology and evolution of the vertebrate head. *Anat Embryol* 195:1-13, 1997
186. Le Douarin NK, Ch.: The Neural Crest. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press, 1999
187. Bolande RP: The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathol* 5:409-429, 1974
188. Bolande RP: Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med* 17:1-25, 1997
189. Le Douarin NM, Teillet MA: Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* 41:162-184, 1974
190. Phillips MT, Kirby ML, Forbes G: Analysis of cranial neural crest distribution in the developing heart using quail-chick chimeras. *Circ Res* 60:27-30, 1987
191. Saldivar JR, Sechrist JW, Krull CE, et al: Dorsal hindbrain ablation results in rerouting of neural crest migration and changes in gene expression, but normal hyoid development. *Development* 124:2729-2739, 1997
192. Ruffins S, Artinger KB, Bronner-Fraser M: Early migrating neural crest cells can form ventral neural tube derivatives when challenged by transplantation. *Dev Biol* 203:295-304, 1998
193. Burns AJ, Le Douarin NM: Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat Rec* 262:16-28, 2001
194. Young HM, Newgreen D: Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *Anat Rec* 262:1-15, 2001
195. Noden DM: Vertebrate craniofacial development: novel approaches and new dilemmas. *Curr Opin Genet Dev* 2:576-581, 1992
196. Trainor PA, Krumlauf R: Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nat Rev Neurosci* 1:116-124, 2000
197. Trainor PA, Sobieszczuk D, Wilkinson D, et al: Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development* 129:433-442, 2002
198. Akam M: Hox genes, homeosis and the evolution of segment identity: no need for hopeless monsters. *Int J Dev Biol* 42:445-451, 1998
199. Baker CV, Bronner-Fraser M: The origins of the neural crest. Part II: an evolutionary perspective. *Mech Dev* 69:13-29, 1997
200. Bronner-Fraser M: Origin of the avian neural crest. *Stem Cells* 13:640-646, 1995
201. Dickinson ME, Selleck MA, McMahon AP, et al: Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* 121:2099-2106, 1995
202. Mayor R, Morgan R, Sargent MG: Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121:767-777, 1995
203. Baker CV, Bronner-Fraser M: The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mech Dev* 69:3-11, 1997

204. Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, et al: Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes & Dev* 13:3136-3148, 1999
205. Vaglia JL, Hall BK: Regulation of neural crest cell populations: occurrence, distribution and underlying mechanisms. *Int J Dev Biol* 43:95-110, 1999
206. Ruffins S, Bronner-Fraser M: A critical period for conversion of ectodermal cells to a neural crest fate. *Dev Biol* 218:13-20, 2000
207. David NB, Saint-Etienne L, Tsang M, et al: Requirement for endoderm and FGF3 in ventral head skeleton formation. *Development* 129:4457-4468, 2002
208. Raible DW, Ragland JW: Reiterated Wnt and BMP signals in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 16:673-682, 2005
209. Zhang J, Chang JY, Huang Y, et al: The FGF-BMP signaling axis regulates outflow tract valve primordium formation by promoting cushion neural crest cell differentiation. *Circ Res* 107:1209-1219, 2010
210. Kumar M, Ray P, Chapman SC: Fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein signaling are required for specifying prechondrogenic identity in neural crest-derived mesenchyme and initiating the chondrogenic program. *Dev Dyn* 241:1091-1103, 2012
211. Hall BK: The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev* 2:3-5, 2000
212. Bronner-Fraser M, Wolf JJ, Murray BA: Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev Biol* 153:291-301, 1992
213. Bilozur ME, Hay ED: Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. *Dev Biol* 125:19-33, 1988
214. Mittal A, Pulina M, Hou SY, et al: Fibronectin and integrin alpha 5 play essential roles in the development of the cardiac neural crest. *Mech Dev* 127:472-484, 2010
215. Larsen WJS, L.S.; Potter, S.S.; Scott, J.: *Human Embryology*, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, 2003
216. Graham A, Koentges G, Lumsden A: Neural Crest Apoptosis and the Establishment of Craniofacial Pattern: An Honorable Death. *Mol Cell Neurosci* 8:76-83, 1996
217. Eickholt BJ, Mackenzie SL, Graham A, et al: Evidence for collapsin-I functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions. *Development* 126:2181-2189, 1999
218. Graham A: The development and evolution of the pharyngeal arches. *J Anat* 199:133-141, 2001
219. Duque-Orsorio JF: Crestas neurales, placodas y arcos branquiales: una revisión evolutiva y embriológica de datos básicos recientes *Rev Acad Colomb Cienc* 27:291-307, 2003
220. Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K: Mammalian craniofacial embryology in vitro. *Int J Dev Biol* 41:187-194, 1997
221. Persaud TV, Moore KL: *Embriología Clínica*. 7ªEd, Elsevier, Barcelona, España, 1999
222. Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, et al: The thymus: a comprehensive review. *Radiographics* 26:335-348, 2006
223. Fawcett DW: *Tratado De Histología*. Madrid, España, Interamericana-Mc Graw-Hill, 1989
224. Miller JF: Immunological function of the thymus. *Lancet* 2:748-749, 1961
225. Romano R, Palamaro L, Fusco A, et al: From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clin Dev Immunol* 2012:467101, 2012
226. Takahama Y: Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127-135, 2006
227. Manley NR: Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol* 12:421-428, 2000
228. Arnaiz AR, J; López, C.: *inmunología*. Ed Complutense, Madrid, España, 1995
229. Delves PJM, S.J; Burton, D.R; Roitt, I.M: *Roitt's Essential Immunology*. USA, Blackwell Publishing, 2006
230. Le Douarin N, Le Lievre C: Demonstration of neural origin of calcitonin cells of ultimobranchial body of chick embryo. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 270:2857-2860, 1970
231. Roediger WE: The oxyphil and C cells of the human thyroid gland. A cytochemical and histopathologic review. *Cancer* 36:1758-1770, 1975

232. Nonidez JF: The origin of the "parafollicular" cell, a second epithelial component of the thyroid gland of the dog. *Am J Anat* 49:479-505, 1932
233. Pearse AG: Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormones, with particular reference to calcitonin and the thyroid C cells. *Vet Rec* 79:587-590, 1966
234. Pearse AG: The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 164:478-487, 1966
235. Foster GV, Macintyre I, Pearse AG: Calcitonin Production and the Mitochondrion-Rich Cells of the Dog Thyroid. *Nature* 203:1029-1030, 1964
236. Bussolati G, Pearse AG: Immunofluorescent localization of calcitonin in the 'C' cells of pig and dog thyroid. *J Endocrinol* 37:205-209, 1967
237. Williams ED: Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Pathol* 19:114-118, 1966
238. Pearse AG: The calcitonin secreting C cells and their relationship to the APUD cell series. *J Endocrinol* 45:Suppl:13-14, 1969
239. Smith LH: The APUD cell concept. *J Surg Oncol* 8:137-142, 1976
240. Lietz H: C-cells: source of calcitonin. A morphological review. *Curr Top Pathol* 55:109-146, 1971
241. Copp DH: Calcitonin: discovery, development, and clinical application. *Clin Invest Med* 17:268-277, 1994
242. Martin-Lacave I, Borrero MJ, Utrilla JC, et al: C cells evolve at the same rhythm as follicular cells when thyroidal status changes in rats. *J Anat* 214:301-309, 2009
243. Peng TC, Cooper CW, Petrusz P, et al: Identification of C-cells in normal and goitrous rat thyroid tissues using antiserum to rat thyrocalcitonin and the immunoperoxidase bridge technique. *Endocrinology* 97:1537-1544, 1975
244. Usenko VS, Lepekhin EA, Lyzogubov VV, et al: The influence of maternal hypothyroidism and radioactive iodine on rat embryonal development: thyroid C-cells. *Anat Rec* 256:7-13, 1999
245. Kracht J, Hachmeister U, Breustedt HJ, et al: Immunohistological studies on thyrocalcitonin in C-cells. *Endokrinologie* 52:395-401, 1968
246. Hazard JB: The C cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. A review. *Am J Pathol* 88:213-250, 1977
247. Sternberger LA, Hardy PH, Jr., Cuculis JJ, et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333, 1970
248. Wolfe HJ, Voelkel EF, Tashjian AH, Jr.: Distribution of calcitonin-containing cells in the normal adult human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab* 38:688-694, 1974
249. Conde E, Martin-Lacave I, Gonzalez-Campora R, et al: Histometry of normal thyroid glands in neonatal and adult rats. *Am J Anat* 191:384-390, 1991
250. Conde E, Martin-Lacave I, Utrilla JC, et al: Postnatal variations in the number and size of C-cells in the rat thyroid gland. *Cell Tissue Res* 280:659-663, 1995
251. Petko M, Rigo G, Varga Z: Quantitative changes of the C-cell population in the rat thyroid during postnatal ontogenesis. *Cell Tissue Res* 166:541-552, 1976
252. McMillan PJ, Heidbuchel U, Vollrath L: Number and size of rat thyroid C cells: no effect of pinealectomy. *Anat Rec* 212:167-171, 1985
253. Teitlebaum SL, Moore KE, Shieber W: Parafollicular cells in the normal human thyroid. *Nature* 230:334-335, 1971
254. Wolfe HJD, R.A.; Voelkel, E.F.; Tashjian, A.H.: Distribution of Calcitonin-Containing Cells in The Normal Neonatal Human Thyroid Gland: A Correlation of Morphology with Peptide Content. *J Endocrinol Metab* 41:1076-1081, 1975
255. Roediger WE: A comparative study of the normal human neonatal and the canine thyroid C cell. *J Anat* 115:255-276, 1973
256. Samaan NA, Hill CS, Jr., Beceiro JR, et al: Immunoreactive calcitonin in medullary carcinoma of the thyroid and in maternal and cord serum. *J Lab Clin Med* 81:671-681, 1973
257. Ezabella MC, Hayashida CY, Bisi H, et al: Early detection of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia type II. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 45:105-109, 1990

258. Hayashida CY, Alves VA, Kanamura CT, et al: Immunohistochemistry of medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia by an affinity-purified anti-human calcitonin antiserum. *Cancer* 72:1356-1363, 1993
259. Toledo SP, Lourenco DM, Jr., Santos MA, et al: Hypercalcitoninemia is not pathognomonic of medullary thyroid carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)* 64:699-706, 2009
260. Borges MF, Abelin NM, Menezes FO, et al: Calcitonin deficiency in early stages of chronic autoimmune thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:69-75, 1998
261. Poppe K, Verbruggen LA, Velkeniers B, et al: Calcitonin reserve in different stages of atrophic autoimmune thyroiditis. *Thyroid* 9:1211-1214, 1999
262. Riancho JAG, J.: Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Madrid, España, Jarpoy Editores, 2004
263. Raisz LG, Kream BE: Regulation of bone formation. *NEJM* 309:29-35, 1983
264. Gehron Robey P: The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 18:858-902, 1989
265. Sakaguchi T, Akizawa T: K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in CKD. *Clin Calcium* 14:9-14, 2004
266. Pfeilschifter J, Laukhuf F, Muller-Beckmann B, et al: Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta I in rat bone. *J Clin Invest* 96:767-774, 1995
267. Pfeilschifter J, Erdmann J, Storch S, et al: Changes in the concentration of insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta I in rat femoral bone during growth. *Calcif Tissue Int* 64:78-82, 1999
268. González Macías J: Fisiopatología de las osteopatías metabólicas., in García-Conde JGM, J. (ed): *Patología General Semiología Clínica y Fisiopatología*. Madrid, McGraw Hill-Interamericana, 2003, pp 885-889
269. Matkovic V: Nutrition, genetics and skeletal development. *J Am Coll Nutr* 15:556-569, 1996
270. Kalkwarf HJ, Zemel BS, Yoltan K, et al: Bone mineral content and density of the lumbar spine of infants and toddlers: influence of age, sex, race, growth, and human milk feeding. *J Bone Miner Res* 28:206-212, 2013
271. Bonjour JPT, R.C.: Factors affecting bone mass in infants and toddlers. *Nutr Bone Dev* 41, 1999
272. Yeste DdR, L; Carrascosa A.: Valores de contenido mineral óseo (CMO), densidad mineral ósea (DMO) y densidad mineral ósea volumétrica (DMOV) en niños y adolescentes en la columna lumbar y en el fémur., in Argente JC, A; Gracia, R; Rodríguez, F. (ed): *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia*. Barcelona, Doyma, 2000, pp 1501-1513
273. Ernst M, Rodan GA: Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH): positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-binding protein BP-3. *Endocrinology* 127:807-814, 1990
274. Carter DRvdM, C.H; Beaupre, G.S: *Skeletal development: mechanical consequences of growth, aging and disease: Osteoporosis*. San Diego, USA, Academic Press, 1996, pp 333-348
275. Girasole G, Giuliani N: The physiopathology of osteoporosis: the role of local factors. *Ann Ital Med Int* 10 Suppl:9S-17S, 1995
276. Manolagas SC, Jilka RL: Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *NEJM* 332:305-311, 1995
277. Roodman GD: Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1:S94-98, 1993
278. Szulc P, Seeman E, Delmas PD: Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteop Int* 11:281-294, 2000
279. Manjon Llorente G, Fernandez-Espuelas C, Gonzalez Lopez JM, et al: Normal values of bone turnover markers in childhood. *An Pediatr (Barc)* 60:330-336, 2004
280. Yeste DdR, L; Carrascosa A.: Valores de contenido mineral óseo (CMO), densidad mineral ósea (DMO) y densidad mineral ósea volumétrica (DMOV) en niños y adolescentes a nivel de la columna lumbar y femoral. *Rev Esp Pediatr* 59:113-118, 2003
281. del Rio Barquero L, Romera Baures M, Pavia Segura J, et al: Bone mineral density in two different socio-economic population groups. *Bone Miner* 18:159-168, 1992
282. Marco Hernandez M, Mendez Fernandez MJ, Ruiz Ramirez JC: Bone mineral density and bone mineral content variations in various communities. *An Esp Pediatr* 52:319-326, 2000
283. Andrews EB, Gilsenan AV, Midkiff K, et al: The US postmarketing surveillance study of adult osteosarcoma and teriparatide: study design and findings from the first 7 years. *J Bone Miner Res* 27:2429-2437, 2012

284. Subbiah V, Madsen VS, Raymond AK, et al: Of mice and men: divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma. *Osteop Int* 21:1041-1045, 2010
285. Johnston CC, Jr., Slemenda CW, Melton LJ, 3rd: Clinical use of bone densitometry. *NEJM* 324:1105-1109, 1991
286. Lu PW, Cowell CT, SA LL-J, et al: Volumetric bone mineral density in normal subjects, aged 5-27 years. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1586-1590, 1996
287. Yeste DdR, L; Gómez, L; Gussinyé, M; Carrascosa, A.: Normal patterns of aparent volumetric bone mineral density in children and adolescents: correlation with projected bone mineral density. *Acta Paediatr* 428 (Supl), 1999
288. Hamdy RC, Petak SM, Lenchik L: Which central dual X-ray absorptiometry skeletal sites and regions of interest should be used to determine the diagnosis of osteoporosis? *J Clin Densitom* 5 Suppl:S11-18, 2002
289. Glastre C, Braillon P, David L, et al: Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1330-1333, 1990
290. Katzman DK, Bachrach LK, Carter DR, et al: Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1332-1339, 1991
291. Perea MG-H, J; Sánchez-Cáler, J: Contenido mineral óseo en niños normales. *An Esp Pediatr* 41:31-35, 1994
292. Carrascosa aG, M; Yeste, D; del Río, L; Audí, L.: Bone mass acquisition during infancy, childhood and adolescence. *Acta Paediatr Suppl* 411:18-23, 1995
293. del Río L, Carrascosa A, Pons F, et al: Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res* 35:362-366, 1994
294. Carrascosa AY, D; Audí, L.: Crecimiento y mineralización del tejido óseo., in Argente JC, A; Gracia, R; Rodríguez, F. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia* (ed): *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia*. Barcelona, Ediciones Doyma, 2000, pp 113-130
295. Carrascosa aG, M; Yeste, D.: Masa ósea, osteopenia osteoporosis., in Argente JC, A; Gracia, R; Rodríguez, F. (ed): *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia* Barcelona, Ediciones Doyma, 2000, pp 1353-1382
296. Yeste D, del Río L, Gussinye M, et al: Bone mineral density in nursing infants and young children (0-4 years old) at the level of the lumbar spine. The normal patterns. *An Esp Pediatr* 49:248-252, 1998
297. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM: The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyns* 220:1-17, 2001
298. Kaufman MH: *The atlas of mouse development*. Edimburg, United Kingdom, Academic Press, 1995
299. Kaufman MHB, J.: *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Edimburg, United Kingdom, Academic Press, 1999
300. Kirby ML, Gale TF, Stewart DE: Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220:1059-1061, 1983
301. Kirby ML, Waldo KL: Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* 82:332-340, 1990
302. Poelmann RE, Mikawa T, Gittenberger-de Groot AC: Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: differentiation and apoptosis. *Dev Dyns* 212:373-384, 1998
303. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, et al: Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127:1607-1616, 2000
304. Poelmann RE, Jongbloed MR, Molin DG, et al: The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction? *Anat Embryol (Berl)* 208:389-393, 2004
305. Nakamura T, Colbert MC, Robbins J: Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Cir Res* 98:1547-1554, 2006
306. Bergwerff M, Verberne ME, DeRuiter MC, et al: Neural crest cell contribution to the developing circulatory system: implications for vascular morphology? *Circ Res* 82:221-231, 1998
307. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC: A subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: multiple functions in heart development? *Dev Biol* 207:271-286, 1999
308. Verberne ME, Gittenberger-De Groot AC, Van Iperen L, et al: Contribution of the cervical sympathetic ganglia to the innervation of the pharyngeal arch arteries and the heart in the chick embryo. *Anat Rec* 255:407-419, 1999

309. Hutson MR, Kirby ML: Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol* 18:101-110, 2007
310. Creazzo TL, Godt RE, Leatherbury L, et al: Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol* 60:267-286, 1998
311. Conway SJ, Godt RE, Hatcher CJ, et al: Neural crest is involved in development of abnormal myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 29:2675-2685, 1997
312. Saint-Jeannet JP: Neural Crest Induction and Differentiation. New York, USA, Springer Science, 2006
313. Maschhoff KL, Baldwin HS: Molecular determinants of neural crest migration. *Am J Med Genet* 97:280-288, 2000
314. Martinsen BJ, Groebner NJ, Frasier AJ, et al: Expression of cardiac neural crest and heart genes isolated by modified differential display. *Gene Expr Patterns* 3:407-411, 2003
315. Stoller JZ, Epstein JA: Cardiac neural crest. *Semin Cell Dev Biol* 16:704-715, 2005
316. Snider P, Olaopa M, Firulli AB, et al: Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage. *Sci World J* 7:1090-1113, 2007
317. Epstein JA, Li J, Lang D, et al: Migration of cardiac neural crest cells in *Spotch* embryos. *Development* 127:1869-1878, 2000
318. Bernd P, Miles K, Rozenberg I, et al: Neurotrophin-3 and TrkC are expressed in the outflow tract of the developing chicken heart. *Dev Dyn* 230:767-772, 2004
319. Tessarollo L, Tsoulfas P, Donovan MJ, et al: Targeted deletion of all isoforms of the *trkC* gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates *trkC* in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14776-14781, 1997
320. Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, et al: Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 14:210-213, 1996
321. Guo T, McDonald-McGinn D, Blonska A, et al: Genotype and cardiovascular phenotype correlations with *TBX1* in 1,022 velo-cardio-facial/DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome patients. *Hum Mutat* 32:1278-1289, 2011
322. Chin AJ, Saint-Jeannet JP, Lo CW: How insights from cardiovascular Dev Biol have impacted the care of infants and children with congenital heart disease. *Mech Dev*, 2012
323. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, et al: *Tbx1* haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410:97-101, 2001
324. Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, et al: *Fgf8* is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 129:4613-4625, 2002
325. Jerome LA, Papaioannou VE: DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet* 27:286-291, 2001
326. Merscher S, Funke B, Epstein JA, et al: *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104:619-629, 2001
327. Vitelli F, Taddei I, Morishima M, et al: A genetic link between *Tbx1* and fibroblast growth factor signaling. *Development* 129:4605-4611, 2002
328. Chen Y, Moon AM, Gaufo GO: Influence of mesodermal *Fgf8* on the differentiation of neural crest-derived postganglionic neurons. *Dev Biol* 361:125-136, 2012
329. Sato A, Scholl AM, Kuhn EB, et al: *FGF8* signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells. *Dev Biol* 354:18-30, 2011
330. Schneider RA, Hu D, Rubenstein JL, et al: Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining *FGF8* and *SHH*. *Development* 128:2755-2767, 2001
331. Li L, Krantz ID, Deng Y, et al: Alagille syndrome is caused by mutations in human *Jagged1*, which encodes a ligand for *Notch1*. *Nat Genet* 16:243-251, 1997
332. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, et al: Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the *Notch* ligand *Jagged1*. *Hum Mol Genet* 8:723-730, 1999
333. Donovan J, Kordylewska A, Jan YN, et al: Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in *Hey2* mutant mice. *Curr Biol* 12:1605-1610, 2002
334. Tallquist MD, Soriano P: Cell autonomous requirement for *PDGFRalpha* in populations of cranial and cardiac neural crest cells. *Development* 130:507-518, 2003

335. Smith CL, Tallquist MD: PDGF function in diverse neural crest cell populations. *Cell Adh Migr* 4:561-566, 2010
336. Lo CW, Cohen MF, Huang GY, et al: Cx43 gap junction gene expression and gap junctional communication in mouse neural crest cells. *Dev Genet* 20:119-132, 1997
337. Clouthier DE, Williams SC, Hammer RE, et al: Cell-autonomous and nonautonomous actions of endothelin-A receptor signaling in craniofacial and cardiovascular development. *Dev Biol* 261:506-519, 2003
338. Conway SJ, Kaartinen V: TGFbeta superfamily signaling in the neural crest lineage. *Cell Adh Migr* 5:232-236, 2011
339. Tiso N, Filippi A, Pauls S, et al: BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mech Dev* 118:29-37, 2002
340. Bachiller D, Klingensmith J, Shneyder N, et al: The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome. *Development* 130:3567-3578, 2003
341. Stottmann RW, Choi M, Mishina Y, et al: BMP receptor 1A is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development* 131:2205-2218, 2004
342. Saint-Jeannet JP, He X, Varmus HE, et al: Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13713-13718, 1997
343. Watanabe Y, Buckingham M: The formation of the embryonic mouse heart: heart fields and myocardial cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* 1188:15-24, 2010
344. Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Struble CA, et al: Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations. *Physiol Genom* 44:518-541, 2012
345. Fukiishi Y, Morriss-Kay GM: Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos. *Cell Tissue Res* 268:1-8, 1992
346. Kirby ML, Waldo KL: Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 77:211-215, 1995
347. Restivo A, Sarkozy A, Digilio MC, et al: 22q11 deletion syndrome: a review of some Dev Biol aspects of the cardiovascular system. *J Cardio Med* 7:77-85, 2006
348. Marino B, Digilio MC, Toscano A, et al: Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med* 3:45-48, 2001
349. Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, et al: A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Pal J* 15:56-62, 1978
350. Jedeke KB, Michels VV, Puga FJ, et al: Velo-cardio-facial syndrome associated with ventricular septal defect, pulmonary atresia, and hypoplastic pulmonary arteries. *Pediatrics* 89:915-919, 1992
351. Cayler GG: Cardiofacial syndrome. Congenital heart disease and facial weakness, a hitherto unrecognized association. *Arch Dis Child* 44:69-75, 1969
352. Giannotti A, Digilio MC, Marino B, et al: Cayler cardiofacial syndrome and del 22q11: part of the CATCH22 phenotype. *Am J Med Genet* 53:303-304, 1994
353. del Campo Casanelles M, Perez Rodriguez J, Garcia Guereta L, et al: Catch-22: current implication of the microdeletion in 22q11. *An Esp Pediatr* 45:341-345, 1996
354. Siebert JR, Graham JM, Jr., MacDonald C: Pathologic features of the CHARGE association: support for involvement of the neural crest. *Teratology* 31:331-336, 1985
355. Noden DM: Origins and patterning of craniofacial mesenchymal tissues. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl* 2:15-31, 1986
356. Franksson C, Alveryd A, Brismar B, et al: Neural crest tumour syndromes. *Acta Chir Scand* 147:105-107, 1981
357. Ayer-Le Lievre C, Fontaine-Perus J: The neural crest: its relations with APUD and paraneuron concepts. *Arch Histol Jpn* 45:409-427, 1982
358. Levard G, Boige N, Vitoux C, et al: Neurocristopathy. The association of Hirschsprung's disease-ganglioneuroma with autonomic nervous system dysfunction in 2 children. *Arch Fr Pediatr* 46:595-597, 1989
359. Patrone PM, Chatten J, Weinberg P: Neuroblastoma and DiGeorge anomaly. *Pediatr Pathol* 10:425-430, 1990
360. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, et al: Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes & Dev* 8:1019-1029, 1994
361. Rohrer T, Trachsel D, Engelcke G, et al: Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies. *Pediatr Pulmonol* 33:71-76, 2002

362. Nakamura T: Genetic markers and animal models of neurocristopathy. *Histol Histopathol* 10:747-759, 1995
363. Gagel RF: ret protooncogene mutations and endocrine neoplasia--a story intertwined with neural crest differentiation. *Endocrinology* 137:1509-1511, 1996
364. Marshall GM, Peaston AE, Hocker JE, et al: Expression of multiple endocrine neoplasia 2B RET in neuroblastoma cells alters cell adhesion in vitro, enhances metastatic behavior in vivo, and activates Jun kinase. *Cancer Res* 57:5399-5405, 1997
365. Waterlow JC: Classification and definition of protein-calorie malnutrition. *Br Med J* 3:566-569, 1972
366. Carrascosa AF, J.M; Fernández, A; López-Siguero, J.P; López, D; Sánchez, E; Grupo Colaborador: Estudios Españoles de Crecimiento 2010. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2 (Suppl), 2011
367. Nunez R: Flow Cytometry for Research Scientists. Principles and Applications, BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, 2011
368. Givan AL: Flow Cytometry: First Principles. New York, USA, Wiley-Liss 2001
369. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al: Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 112:973-980, 2003
370. Antón MR, L.M. Asociación Española De Nefrología Pediátrica: Nefrología Pediátrica: Manual Práctico., Editorial Médica Panamericana, 2011
371. Gamallo C, Garcia M, Palacios J, et al: Decrease in calcitonin-containing cells in truncus arteriosus. *Am J Med Genet* 46:149-153, 1993
372. Petiet AE, Kaufman MH, Goddeeris MM, et al: High-resolution magnetic resonance histology of the embryonic and neonatal mouse: a 4D atlas and morphologic database. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12331-12336, 2008
373. Greene E: Anatomy of the rat, Mcmillan Publishing Company, London, 1970
374. Petiet A, Hedlund L, Johnson GA: Staining methods for magnetic resonance microscopy of the rat fetus. *JMRI* 25:1192-1198, 2007
375. Martinez L, Pederiva F, Martinez-Calonge W, et al: The myenteric plexus of the esophagus is abnormal in an experimental congenital diaphragmatic hernia model. *Eur J Pediatr Surg* 19:163-167, 2009
376. Safavi A, Synnes AR, O'Brien K, et al: Multi-institutional follow-up of patients with congenital diaphragmatic hernia reveals severe disability and variations in practice. *J Pediatr Surg* 47:836-841, 2012
377. Rocha G, Azevedo I, Pinto JC, et al: Follow-up of the survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Early Hum Dev* 88:255-258, 2012
378. Stevens CA, Carey JC, Shigeoka AO: Di George anomaly and velocardiofacial syndrome. *Pediatrics* 85:526-530, 1990
379. Passero LMC, B; González, F et al: Características clínicas e inmunológicas de veinte pacientes con síndrome de Di George. *Rev Esp Pediatr* 61:201-206, 2005
380. Rhoden DK, Leatherbury L, Helman S, et al: Abnormalities in lymphocyte populations in infants with neural crest cardiovascular defects. *Pediatr Cardiol* 17:143-149, 1996
381. Radford DJ, Lachman R, Thong YH: The immunocompetence of children with congenital heart disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 81:331-336, 1986
382. Bockman DE, Kirby ML: Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 223:498-500, 1984
383. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ: An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *The J Exper Med* 191:1051-1056, 2000
384. Kuratani S, Bockman DE: Capacity of neural crest cells from various axial levels to participate in thymic development. *Cell Tissue Res* 263:99-105, 1991
385. Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, et al: Identification of neural crest derived cells within the cellular microenvironment of the human thymus employing a library of monoclonal antibodies raised against neuronal tissues. *In Vivo* 10:39-47, 1996
386. Yamauchi Y, Abe K, Mantani A, et al: A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. *Dev Biol* 212:191-203, 1999
387. Dorsky RI, Moon RT, Raible DW: Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396:370-373, 1998

388. Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, et al: Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol* 32:967-971, 2002
389. Manley NR, Capecchi MR: Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* 192:274-288, 1997
390. Takihara Y, Tomotsune D, Shirai M, et al: Targeted disruption of the mouse homologue of the *Drosophila* polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* 124:3673-3682, 1997
391. Conway SJ, Henderson DJ, Copp AJ: Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the splotch (Sp2H) mutant. *Development* 124:505-514, 1997
392. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al: Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 130:388-393, 1997
393. Denny T, Yogev R, Gelman R, et al: Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 267:1484-1488, 1992
394. Suzuki H: Calcitonin levels in normal individuals with new highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay. *J Clin Lab Anal* 12:218-222, 1998
395. Brauner R, Le Harivel de Gonville A, Kindermans C, et al: Parathyroid function and growth in 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr* 142:504-508, 2003
396. Taylor SC, Morris G, Wilson D, et al: Hypoparathyroidism and 22q11 deletion syndrome. *Arch Dis Child* 88:520-522, 2003
397. Grigorieva IV, Thakker RV: Transcription factors in parathyroid development: lessons from hypoparathyroid disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1237:24-38, 2011
398. Kameda Y, Arai Y, Nishimaki T, et al: The role of Hoxa3 gene in parathyroid gland organogenesis of the mouse. *J Histochem Cytochem* 52:641-651, 2004
399. Deng YJ, Qiao DF, Tang N, et al: Infantile DiGeorge syndrome: autopsy diagnosis and clinicopathologic analysis in 5 cases. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 41:742-746, 2012
400. Cuneo BF, Langman CB, Ilbawi MN, et al: Latent hypoparathyroidism in children with conotruncal cardiac defects. *Circulation* 93:1702-1708, 1996
401. Koch A, Hofbeck M, Buheitel G, et al: Hypoparathyroidism in conotruncal heart defects. *Eur J Pediatr* 161:208-211, 2002
402. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, et al: Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34:798-804, 1997
403. Benedetti WG, G; Roca, R.: ~~OBJ~~ Determinación por radioinmunoensayo de calcitonina sérica basal y post estímulo con pentagastrina y gluconato de calcio, en pacientes con riesgo de padecer carcinoma medular tiroideo. *Rev Med Uruguay* 8:54-60, 1992
404. Theodorou DJ, Theodorou SJ: Dual-energy X-ray absorptiometry in clinical practice: application and interpretation of scans beyond the numbers. *Clin Imaging* 26:43-49, 2002
405. Burke BA, Johnson D, Gilbert EF, et al: Thyrocalcitonin-containing cells in the Di George anomaly. *Human pathology* 18:355-360, 1987
406. Saito K, Yaginuma N, Takahashi T: Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *Tohoku J Exp Med* 129:273-283, 1979
407. Bugnon C, Fellmann D, Blahser S, et al: Immunocytological studies of C cells with anti-calcitonin or antisomatostatin immunoserums in rats treated with vitamin D, thyroxine or benzyl-thiouracil. *C R Seances Soc Biol Fil* 172:691-696, 1978
408. Stoll R, Faucounau N, Maraude R: Development of follicular and parafollicular adenomas in the thyroid of rats treated with thiamazole (author's transl). *Ann Endocrinol (Paris)* 39:179-189, 1978
409. Scheuba C, Kaserer K, Kotzmann H, et al: Prevalence of C-cell hyperplasia in patients with normal basal and pentagastrin-stimulated calcitonin. *Thyroid* 10:413-416, 2000
410. Dadan J, Sawicki B, Chyczewski L, et al: Preliminary immunohistochemical investigations of human thyroid C cells in the simple and hyperactive nodular goitre. *Folia Histochem Cytobiol* 39:189-190, 2001
411. Zbucki RL, Winnicka MM, Sawicki B, et al: Alteration of parafollicular (C) cells activity in the experimental model of hypothyroidism in rats. *Folia Histochem Cytobiol* 45:115-121, 2007
412. Xia H, Otten C, Migliazza L, et al: Tracheobronchial malformations in experimental esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 34:536-539, 1999



413. Stoll C, Alembik Y, Dott B, et al: Associated malformations in cases with congenital diaphragmatic hernia. *Genet Couns* 19:331-339, 2008
414. Lin AE, Pober BR, Adatia I: Congenital diaphragmatic hernia and associated cardiovascular malformations: type, frequency, and impact on management. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C:201-216, 2007
415. Frenckner B, Palmer K, Linden V: Neonates with congenital diaphragmatic hernia have smaller neck veins than other neonates-An alternative route for ECMO cannulation. *J Pediatr Surg* 37:906-908, 2002
416. Fisher JC, Jefferson RA, Kuenzler KA, et al: Challenges to cannulation for extracorporeal support in neonates with right-sided congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 42:2123-2128, 2007
417. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC: A subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: multiple functions in heart development? *Dev Biol* 207:271-286, 1999
418. Hildreth V, Webb S, Bradshaw L, et al: Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart. *J Anat* 212:1-11, 2008
419. Smith BR, Effmann EL, Johnson GA: MR microscopy of chick embryo vasculature. *JMRI* 2:237-240, 1992
420. Smith BR, Johnson GA, Groman EV, et al: Magnetic resonance microscopy of mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3530-3533, 1994
421. Ferrari VA, Fisher SA: Imaging the embryonic heart: how low can we go? How fast can we get? *J Mol Cell Cardiol* 35:141-143, 2003
422. Danzer E, Schwarz U, Wehrli S, et al: Retinoic acid induced myelomeningocele in fetal rats: characterization by histopathological analysis and magnetic resonance imaging. *Experimental neurology* 194:467-475, 2005
423. Hogers B, van der Weerd L, Olofsen H, et al: Non-invasive tracking of avian development in vivo by MRI. *NMR Biomed* 22:365-373, 2009
424. Schwindt W, Burke M, Pillekamp F, et al: Functional magnetic resonance imaging and somatosensory evoked potentials in rats with a neonatally induced freeze lesion of the somatosensory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1409-1418, 2004
425. Lima JA, Desai MY: Cardiovascular magnetic resonance imaging: current and emerging applications. *Journal of the American College of Cardiology* 44:1164-1171, 2004
426. Tyszka JM, Fraser SE, Jacobs RE: Magnetic resonance microscopy: recent advances and applications. *Curr Opin Biotechnol* 16:93-99, 2005
427. Meng S, Qiao M, Scobie K, et al: Evolution of magnetic resonance imaging changes associated with cerebral hypoxia-ischemia and a relatively selective white matter injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 59:554-559, 2006
428. Fau S, Po C, Gillet B, et al: Effect of the reperfusion after cerebral ischemia in neonatal rats using MRI monitoring. *Experimental neurology* 208:297-304, 2007
429. Wideroe M, Olsen O, Pedersen TB, et al: Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Neuroimage* 45:880-890, 2009
430. Price AN, Cheung KK, Cleary JO, et al: Cardiovascular magnetic resonance imaging in experimental models. *Open Cardiovasc Med J* 4:278-292, 2010
431. Smith BR: Magnetic resonance microscopy in cardiac development. *Microsc Res Tech* 52:323-330, 2001
432. Schneider JE, Bamforth SD, Grieve SM, et al: High-resolution, high-throughput magnetic paragraph sign resonance imaging of mouse embryonic paragraph sign anatomy using a fast gradient-echo sequence. *Magma* 16:43-51, 2003
433. Schneider JE, Bamforth SD, Farthing CR, et al: Rapid identification and 3D reconstruction of complex cardiac malformations in transgenic mouse embryos using fast gradient echo sequence magnetic resonance imaging. *J Mol Cell Cardiol* 35:217-222, 2003
434. Wadghiri YZ, Schneider AE, Gray EN, et al: Contrast-enhanced MRI of right ventricular abnormalities in Cx43 mutant mouse embryos. *NMR Biomed* 20:366-374, 2007
435. Driehuys B, Nouis J, Badea A, et al: Small animal imaging with magnetic resonance microscopy. *Ilar J* 49:35-53, 2008
436. Hoydu AK, Kitano Y, Kriss A, et al: In vivo, in utero microscopic magnetic resonance imaging: application in a rat model of diaphragmatic hernia. *Magn Reson Med* 44:331-335, 2000
437. Schneider JE, Bose J, Bamforth SD, et al: Identification of cardiac malformations in mice lacking Ptdsr using a novel high-throughput magnetic resonance imaging technique. *BMC Dev Biol* 4:16, 2004

438. Bock NA, Nieman BJ, Bishop JB, et al: In vivo multiple-mouse MRI at 7 Tesla. *Magn Reson Med* 54:1311-1316, 2005
439. Bock NA, Konyer NB, Henkelman RM: Multiple-mouse MRI. *Magn Reson Med* 49:158-167, 2003
440. Johnson GA, Ali-Sharief A, Badea A, et al: High-throughput morphologic phenotyping of the mouse brain with magnetic resonance histology. *Neuroimage* 37:82-89, 2007
441. Johnson GA, Cofer GP, Fubara B, et al: Magnetic resonance histology for morphologic phenotyping. *JMRI* 16:423-429, 2002
442. Matsuda Y, Utsuzawa S, Kurimoto T, et al: Super-parallel MR microscope. *Magn Reson Med* 50:183-189, 2003
443. Schneider JE, Bamforth SD, Farthing CR, et al: High-resolution imaging of normal anatomy, and neural and adrenal malformations in mouse embryos using magnetic resonance microscopy. *J Anat* 202:239-247, 2003
444. Schneider JE, Bhattacharya S: Making the mouse embryo transparent: identifying developmental malformations using magnetic resonance imaging. *Birth defects research Part C, Embryo today:reviews* 72:241-249, 2004
445. Coakley FV, Hricak H, Filly RA, et al: Complex fetal disorders: effect of MR imaging on management--preliminary clinical experience. *Radiology* 213:691-696, 1999
446. Dhenain M, Ruffins SW, Jacobs RE: Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Dev Biol* 232:458-470, 2001

ANEXOS

ANEXO I

AUTORIZACIÓN DEL CEIC DEL HOSPITAL LA PAZ PARA LA REALIZACION DEL ESTUDIO

 **Hospital Universitario La Paz**
SaludMadrid 

INFORME DEL COMITE ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Antonio Gil Aguado, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA


Que este Comité ha evaluado la propuesta de la Dra. Ana Lourdes Luis Huertas del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil para que se realice el proyecto de investigación titulado **"ESTUDIO EXPERIMENTAL Y CLÍNICO DE NUEVOS COMPONENTES DE DISFUNCIÓN NEUROCRISTAL EN LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA; ANOMALÍAS DEL SISTEMA VENOSO CÉRVICO-TORÁCICO Y DE LA FUNCIÓN TÍMICA, NEUROENDOCRINA TIROIDEA Y PARATIROIDEA"**, código HULP: PI-577

y considera que teniendo en cuenta la respuesta a las aclaraciones solicitadas:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios de disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado en el Hospital Universitario La Paz por la Dra. Ana Lourdes Luis Huertas del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 28 de Septiembre de 2007



Firmado:
Don Antonio Gil Aguado

ANEXO II

HOJA DE INFORMACIÓN A PADRES/TUTORES DE PACIENTES CON HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA

ESTUDIO EXPERIMENTAL Y CLINICO DE NUEVOS COMPONENTES DE DISFUNCION NEUROCRISTAL EN LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA: ANOMALIAS DEL SISTEMA VENOSO CERVICO-TORACICO Y DE LA FUNCIÓN TÍMICA, NEUROENDOCRINA TIROIDEA Y PARATIROIDEA.

Médico Responsable: Dra Ana Lourdes Luis Huertas. S° Cirugía Pediátrica.

Hospital Universitario La paz.

INFORMACIÓN A PADRES/ TUTORES

El Departamento de Cirugía Pediátrica y en concreto los investigadores del proyecto denominado: “ Estudio experimental y clínico de nuevos componentes de disfunción neurocristal en la hernia diafragmática congénita: anomalías del sistema venoso cérvico-torácico y de la función tímica, neuroendocrina tiroidea y paratiroidea”, proponen a los padres / tutores del paciente su participación en los estudios de investigación clínica del mismo.

El principal objetivo de estos estudios es el mejor conocimiento del origen de la hernia diafragmática congénita (HDC) y de sus malformaciones asociadas, con el fin de poder mejorar su tratamiento global y así disminuir en un futuro el número de complicaciones y secuelas a lo largo de la vida de estos pacientes. Intentamos conseguir estos objetivos mediante el hallazgo y conocimiento de alteraciones clínicas en humanos (pacientes diagnosticados de HDC) ya demostradas en animales de experimentación. En concreto nos interesamos por el estado del sistema inmunológico dependiente del timo, el funcionamiento de células de la glándula tiroides (células parafoliculares o “células C”) que influyen en los niveles del calcio en la sangre y la función de las glándulas paratiroides que también participan en la regulación de los niveles de calcio en el organismo. De los resultados obtenidos de este estudio podríamos confirmar o descartar alteraciones inmunológicas (que potencialmente podrían ocasionar mayor número de infecciones en este tipo de pacientes); así como alteraciones en el crecimiento, en los niveles de calcio en suero o en la mineralización ósea.

Las actuaciones necesarias a realizar en los pacientes que quisieran participar en este protocolo serían las que describimos a continuación:

1. **Entrevista clínica y exploración física** completa del paciente, insistiendo en parámetros de crecimiento como el peso y la talla. Se realizaría en la consulta de Cirugía Pediátrica intentando hacerla coincidir con su revisión rutinaria correspondiente en este Servicio. Sólo sería necesario llevarla a cabo en una ocasión a lo largo de todo el estudio.
2. **Análisis de sangre** (en ayunas) para el estudio de calcio y otras sustancias que intervienen en la regulación de los niveles de calcio en sangre: fósforo, vitamina D, osteocalcina, paratohormona (hormona liberada por las glándulas paratiroides) y calcitonina (sustancia liberada en el tiroides). Además la extracción sanguínea se utilizaría para el estudio de los linfocitos en sangre (“células de defensa”) y para extracción de material genético (que se guardaría en el banco de ADN del Servicio de Genética de este hospital) para futuros estudios genéticos. Esta última prueba se realizaría sólo en aquellos casos en los que los padres y/o el paciente (menor maduro) dieran su consentimiento específico para ella, como se detalla en la hoja de información para estudios genéticos.

El análisis de sangre se practicaría como cualquier analítica convencional mediante punción de una vena periférica del organismo (venopunción), por lo general de la parte anterior del codo o del dorso de la mano; procedimiento que detallamos a continuación.

Venopunción periférica: limpieza del lugar de punción con un antiséptico y posterior colocación de una una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo con el fin de obtener la dilatación de la vena. Introducción de una aguja en la vena y recolección de la sangre extraída en un frasco hermético o en una jeringa. Retirada de la aguja y colocación de apósito o gasa en el sitio de la punción para detener cualquier sangrado.

Los riesgos de la venopunción son raros, pudiendo existir: sangrado, hematoma (acumulación de sangre por debajo de la piel), infección superficial de la piel, o punciones múltiples para localización de las venas.

3. **Análisis de orina** (una micción aislada o micciones de 24 horas) para el estudio del calcio y el resto de sustancias involucradas en la regulación de los niveles de calcio en el organismo ya descritas en el punto 2.

4. **Densitometría ósea.** Se trata de una prueba de imagen que mide la densidad y mineralización ósea., siendo la prueba ideal para la detección de pérdida ósea y del riesgo de posibles fracturas. La densitometría se realizaría en el Servicio de Medicina Nuclear del hospital La Paz. Se trata de un procedimiento simple, rápido y no invasivo (dosis baja de rayos X) que no precisa de ayunas, sedación ni anestesia para su realización. Su duración es de 20 –30 minutos y el paciente estaría acompañado de un familiar / tutor durante su realización. Dicha prueba sería informada e interpretada por los facultativos del Servicio de Medicina Nuclear y entregada personalmente al paciente para su entrega en la consulta de Cirugía Pediátrica, de tal forma que los pacientes tuvieran la posibilidad de ser informados de su resultado en el mismo día de su realización.
5. **Estudio de la edad ósea:** la realizaríamos en pacientes mayores de 8 años (*niños*) y 7 años (*niñas*). La edad ósea se estudia a través del análisis de una radiografía de muñeca y mano izquierda, la cual indica si existe adelanto o retardo en su maduración, y si éste es normal para la población de referencia. En otras ocasiones (no en este estudio), se utiliza en la predicción de la talla adulta, que junto a la talla del niño o adolescente y el potencial genético en talla de ambos padres, permiten caracterizar las variantes normales del crecimiento y la maduración, y es útil al profesional de la salud para diferenciarlas de las variantes patológicas. La muñeca y la mano, son las zonas más convenientes para valorar la maduración ósea, no sólo porque allí existen centros de osificación que suministran una gran información, sino también por encontrarse lejos de las gónadas (genitales) y necesitar menos irradiación.

Por supuesto, queremos insistir en los derechos de los pacientes que quisieran participar en este estudio de investigación clínica, y que citamos a continuación:

- 1).- la participación es siempre voluntaria, existiendo siempre la posibilidad de no participar, “sin perjuicio” de los cuidados médicos asistenciales que precise el paciente.
- 2).- la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento “sin perjuicios” para el paciente ni su familia/tutor.
- 3).- La familia y el paciente que participara en el estudio sería consciente de “no obtener beneficio” de la participación en el proyecto, con respecto a otros pacientes.

- 4).- La seguridad de que se guardaría en todo momento la confidencialidad de los datos personales de los pacientes según la L.O.P.D. 15/1999.
- 5).- El equipo investigador tendría la posibilidad de publicar los resultados del estudio en congresos médicos o reuniones salvaguardando siempre la confidencialidad de los datos personales de los participantes.

Les recordamos que pueden ponerse en contacto con nosotros para resolver cualquier duda pendiente, llamando al teléfono de la consulta de Cirugía Pediátrica: 917277152, preguntando preferiblemente por la Dra Luis.

Atentamente,

Dra Ana Lourdes Luis Huertas

Médico Adjunto de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario La Paz.

ANEXO III

HOJA DE INFORMACIÓN DIRIGIDA A PADRES/TUTORES DE PARTICIPANTES SANOS (“CONTROLES”).

ESTUDIO EXPERIMENTAL Y CLINICO DE NUEVOS COMPONENTES DE DISFUNCION NEUROCRISTAL EN LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA: ANOMALIAS DEL SISTEMA VENOSO CERVICO-TORACICO Y DE LA FUNCIÓN TÍMICA, NEUROENDOCRINA TIROIDEA Y PARATIROIDEA.

Médico Responsable: Dra Ana Lourdes Luis Huertas. Sº Cirugía Pediátrica.

Hospital Universitario La paz.

INFORMACIÓN A PADRES/TUTORES

El Departamento de Cirugía Pediátrica y en concreto los investigadores del proyecto denominado: “ Estudio experimental y clínico de nuevos componentes de disfunción neurocristal en la hernia diafragmática congénita: anomalías del sistema venoso cérvico-torácico y de la función tímica, neuroendocrina tiroidea y paratiroidea”, proponen a los padres / tutores de su participación en los estudios de investigación clínica del mismo, como representante de la población sana (“población control”) de este estudio.

Se trata de un estudio sobre la hernia diafragmática congénita: una malformación producida durante el embarazo, que aparece con una frecuencia de 1/2500-3000 recién nacidos vivos. Consiste en una alteración en el diafragma (músculo que separa el abdomen del torax) en forma de orificio que produce el paso de las vísceras abdominales (intestino, bazo, hígado o estómago) al interior de la cavidad torácica impidiendo el buen desarrollo de los pulmones, que son pequeños y tienen su función disminuída, produciendo alteraciones en la ventilación pulmonar en el momento del nacimiento y en algunos pacientes también a lo largo de su vida.

El objetivo principal de este trabajo es conocer mejor el origen de la hernia diafragmática congénita y confirmar la existencia de otras anomalías en otros órganos asociadas a esta malformación, con el fin de poder mejorar su tratamiento global y así disminuir en un futuro el número de complicaciones y complicaciones a largo plazo en estos pacientes. Estos órganos “sospechosos” de afectación son el tiroides, el timo y las paratiroides: glándulas situadas en el cuello que tienen la función de: 1)producir células de defensa frente a infecciones(linfocitos), en

el caso del timo y 2) regular los niveles de calcio en el organismo: acción ejercida por las paratiroides y el tiroides.

Para el estudio de estos órganos realizaríamos las pruebas que describimos a continuación, siendo necesaria la comparación de estos datos entre los pacientes con hernia diafragmática y niños sanos. De esta forma podríamos interpretar de forma correcta sus resultados y sacar conclusiones válidas, razón por la cual nos dirigimos a los padres de niños sanos para esta enfermedad.

Las pruebas a realizar en su hijo serían:

- I. **Entrevista clínica y exploración física** del participante, insistiendo en parámetros de crecimiento como el peso y la talla. Se realizaría en la consulta de Cirugía Pediátrica coincidiendo con su cita para la petición del estudio preoperatorio para la intervención quirúrgica de su patología menor a la que será sometido de forma programada.

Sólo sería necesario llevarla a cabo en una ocasión a lo largo de todo el estudio.

- II. **Análisis de sangre** (en ayunas) para el estudio del calcio y de otras sustancias como el fósforo, vitamina D, paratohormona, calcitonina u osteocalcina, que regulan los niveles de calcio en la sangre.:Además se realizaría una cuantificación de los linfocitos (células de la defensa) que se producen en el timo.

Se trata de un análisis de sangre convencional, cuya técnica describimos a continuación: punción de una vena periférica (venopunción), por lo general de la parte anterior del codo o del dorso de la mano y extracción de la sangre en un frasco hermético o en una jeringa.

Los riesgos de la venopunción son raros, pudiendo existir: ligero sangrado, hematoma (acumulación de sangre por debajo de la piel),o infección superficial de la piel.

- III. **Análisis de orina** (recogida de toda la orina de 24 horas en un frasco) para el estudio del calcio y el resto de sustancias involucradas en su regulación ya descritas en el punto 2.

Por supuesto y ante todo queremos insistir en que vuestra participación sería siempre voluntaria, en la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento sin ningún perjuicio; así como garantizar la confidencialidad e intimidad del participante durante toda la duración del estudio, según la ley L.O.P.D 15/1999.

También os informamos de la posibilidad de publicar los resultados del presente proyecto por parte del equipo investigador, en congresos médicos, salvaguardando siempre la confidencialidad de los datos personales de los participantes.

Les recordamos que pueden ponerse en contacto con nosotros para resolver cualquier duda pendiente, llamando al teléfono de la consulta de Cirugía Pediátrica del Hospital La Paz: 917277152, preguntando preferiblemente por la Dra Luis.

Atentamente,

Dra Ana Lourdes Luis Huertas

Médico Adjunto de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario La Paz.

ANEXO IV**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DEL
PADRE/TUTOR**

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “ ESTUDIO EXPERIMENTAL Y CLINICO DE NUEVOS COMPONENTES DE DISFUNCION NEUROCRISTAL EN LA HERNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA: ANOMALÍAS DEL SISTEMA VENOSO CÉRVICO-TORÁCICO Y DE LA FUNCIÓN TÍMICA, NEUROENDOCRINA TIROIDEA Y PARATIROIDEA”

Promotor : Dra Ana Lourdes Luis Huertas

Yo (nombre y apellidos).....en calidad de (indicar parentesco o relación con el menor)y representante de (indicar el nombre y apellidos del menor).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la Dra Luis Huertas, quien me ha explicado el contenido y objetivos del proyecto y se ha comprometido a aclarar posibles dudas que puedan surgir en cualquier momento del mismo.

Comprendo que la participación de mi representado es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar del estudio a mi representado:

1° Cuando quiera

2° Sin tener que dar explicaciones.

3° Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para que mi representado participe en el estudio.

FIRMA DEL REPRESENTANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FECHA:

FECHA:

ANEXO V. PROTOCOLO DEL ESTUDIO CLÍNICO

NOMBRE:

NHC:

APELLIDOS:

F. Nacimiento:

Fecha entrada estudio:

Edad:

I.- Entrevista clínica ☐

Fecha -----

I. Antecedentes obstétricos

Diagnóstico prenatal ☐ SI ☐ NO ☐ EG

Diagnóstico de otras malformaciones

Enfermedades maternas

Exposición a fármacos /teratógenos

Parto ☐ Vaginal ☐ Cesárea

☐ PRN ☐ Talla

II. Malformaciones asociadas

- Cardiopatía NO ☐ SI ☐ Tipo -----
- Maxilofaciales NO ☐ SI ☐ Tipo -----
- ORL NO ☐ SI ☐ Tipo -----
- R.dismórficos NO ☐ SI ☐ Tipo -----
- Otras

III. Hipocalcemia

- Neonatal ☐ Fuera de período neonatal ☐
- Estridor laríngeo ☐ Dolor muscular/Debilidad ☐
 - Otros síntomas ☐
 - Tratamiento SI ☐ NO ☐

IV. Infecciones recurrentes:

- Tipo N° -----
- Edad
- Gravedad: Ingreso NO ☐ SI ☐ N° -----

V. Enfermedades autoinmunes NO ☐ SI ☐ -----

VI. Reacciones transfusionales NO ☐ SI ☐

VII. RGE NO ☐ SI ☐

Otros síntomas digestivos NO ☐ SI ☐

VIII. Neumopatía NO ☐ SI ☐

IX. Retraso psicomotor/neurocognitivo NO ☐ SI ☐ Síntomas -----

X. Deformidades torácicas NO ☐ SI ☐ Tipo -----

XI. Antropometría

Peso (Kg)	Percentil -----	DE -----
Talla (cm)	Percentil -----	DE -----
I. Nutricionales	I. Shukla -----	I. Waterlow-----

2.- Estudio de la función tiroidea

Fecha -----

- ☐
- Citometría de flujo

3.- Estudio del metabolismo fosfocálcico

Fecha -----

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> FGE (I. Schwartz) | |
| <input type="checkbox"/> Calcio total sérico | <input type="checkbox"/> Calcio iónico sérico |
| <input type="checkbox"/> Calciuria/24h | <input type="checkbox"/> Cociente Ca_o/Cr_o |
| <input type="checkbox"/> Fósforo sérico | <input type="checkbox"/> RTP |
| <input type="checkbox"/> PTH _i sérica | <input type="checkbox"/> Vitamina D |
| <input type="checkbox"/> Calcitonina sérica | |
| <input type="checkbox"/> Fosfatasa Alcalina | <input type="checkbox"/> Osteocalcina |

4.- Estudio de la Mineralización Ósea:

- ☐
- Densitometría Ósea

Fecha -----

ANEXO VI. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LOS PACIENTES CON HDC Y LOS SUJETOS DEL GRUPO CONTROL

		Leucocitos	Linf T	CD3	CD4	CD4Ra	CD4Ro	CD8	CD8Ra	CD8Ro	Linf B	NK	CD I	CD45+CD3+DR	PANT
HDC1	16a	7630	1330 17,4%	957,6 72%	545,3 41%	133 10%	305,9 23%	372,4 28%	212,8 16%	186,2 14%	186,2 14%	172,9 13%	0	66,5 5%	970,9 73%
HDC2	15a	ND	ND	58%	30%	17%	10%	22%	34%	12%	6%	35%	0	1%	84%
HDC3	12a	ND	ND	71%	39%	25%	13%	30%	27%	7%	12%	16%	0	4%	73%
HDC4	11a	5360	2940 54,8%	1969,8 67%	1146,6 39%	617,4 21%	294 10%	735 25%	646,8 22%	176,4 6%	470,4 16%	441 15%	0	ND	2263 77%
HDC5	9a	6505	2320 35,6%	1461,6 63%	835,2 36%	602 25,9%	271 11,6%	464 20%	522 22,5%	199 8,57%	496 21,3%	370 16%	0	ND	1832 79%
HDC6	8a	7880	2750 34,9%	1595 58%	605 22%	412,5 15%	247,5 9%	770 28%	632,5 23%	275 10%	412,5 15%	632,5 23%	0	192,5 7%	1870 68%
HDC7	4a	ND	ND	60%	31%	23%	7%	12%	18%	2%	18%	20%	0	2%	74%
HDC8	7a	ND	ND	62%	36%	19%	14%	25%	20%	5%	21%	14%	0	2%	63%
HDC9	5a	7950	2830 35,6%	2122,5 75%	849 30%	622,6 22%	254,7 9%	1216,9 43%	1018,8 36%	141,5 5%	396,2 14%	226,4 8%	0	254,7 9%	2320,6 82%
HDC10	5a	10070	4710 46,8%	3532,5 75%	1601,4 34%	1271,7 27%	565,2 12%	1742,7 37%	1271,7 27%	565,2 12%	894,9 19%	235,5 5%	0	329,7 7%	3579,6 76%
HDC11	5a	ND	ND	68%	31%	ND	ND	31%	ND	ND	11%	14%	0	ND	
HDC12	4a	7980	1750 21,9%	1172,5 67%	647,5 37%	420 24%	157,5 9%	280 16%	280 16%	35 2%	350 20%	280 16%	0	35 2%	1225 70%
HDC13	4a	6750	2820 41,8%	1617,4 57%	1128 40%	676,8 24%	282 10%	479,4 17%	564 20%	112,8 4%	676,8 24%	535,8 19%	0	84,6 3%	1889,4 67%
HDC14	3a	8640	4700 54,4%	3525 75%	2350 50%	1598 34%	423 9%	1081 23%	1034 22%	188 4%	705 15%	423 9%	0	94 2%	3807 81%
HDC15	3a	8820	4580 51,9%	3480 76%	1740,4 38%	1374 30%	212,8 7%	1145 25%	824,4 18%	183,2 4%	824,4 18%	229 5%	0	137,4 3%	3526,6 77%

HDC16	3a	5570	3040 54,5%	3013,2 62%	972,8 32%	334,4 11%	212,8 7%	668,8 22%	395,2 13%	121,6 4%	1033,6 34%	152 5%	0	121,6 4%	1824 60%
HDC17	2a	11030	4860 44,1%	3013,2 62%	1458 30%	874,8 18%	437,4 9%	1312,2 27%	972 20%	388,8 8%	874,8 18%	923,4 19%	0	340,2 7%	ND
HDC18	3a	15980	6710 (42%)	4160,2 (62%)	2549,8 (38%)	1677,5 (25%)	268,4 (4%)	1274,9 (19%)	1006,5 (15%)	134,2 (2%)	2013 (30%)	469,7 (7%)	0	201,3 (3%)	4294,4 (64%)
HDC19	4a	ND	ND	74%	41%	27%	6%	31%	29%	3%	15%	8%	0	2%	81%
HDC20	2a	9957	4007 (40,1%)	2520 (62,8)	1300,1 (32,4%)	720 (17,9%)	439 (10,9%)	801,4 (20%)	551 (13,7%)	98,7 (2,46%)	761 (19%)	152 (3,8%)	ND	ND	ND
HDC21	3a	ND	ND	67%	44%	35%	11%	16%	13%	3%	29%	ND	0	2%	68%
HDC22	2a	6990	3210 45,9%	2365,4 74%	1669,2 52%	1219,8 38%	192,6 6%	513,6 16%	417,3 13%	32,1 1%	642 20%	224,7 7%	0	64,2 (2%)	2407,5 (75%)
HDC23	2a	8100	3564 (44%)	2530,4 (71%)	1496,8 42%	819,7 23%	285,1 8%	712 20%	605,8 17%	106,9 3%	891 25%	142,56 4%	0	8%	70%
HDC24	2a	ND	ND	77%	47%	30%	8%	24%	18%	4%	13%	10%	0	4%	82%
HDC25	11m	9230	4110 (44,5%)	2466 (60%)	1397,4 (34%)	1150,8 (28%)	452,1 (11%)	1068,6 (26%)	1027,5 (25%)	123,3 (3%)	642 (20%)	224,7 (7%)	0	64,2 (2%)	2407,5 (75%)
HDC26	1a	27910	3349	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HDC27	15m	4450	2390 (53,8%)	1720,8 (72%)	1003,8 42%	645,3 27%	262,9 (11%)	573,6 24%	454,1 19%	71,7 (3%)	358,5 (15%)	382,4 (16%)	0	71,7 (3%)	1792,5 (75%)
HDC28	18m	ND	ND	59%	38%	32%	6%	16%	24%	1%	20%	21%	0	5%	66%
HDC29	18m	ND	6890 (50,7%)	4983 (68%)	2907 (39,%)	1903,7 26%	275,6 (4%)	1610,8 22%	1033 (15%)	21,9 (3%)	1317,9 18%	512,4 7%	0	ND	ND
HDC30	5m	13964	5306 (38%)	3714,4 70%	1538,8 (29%)	902 17%	636,7	1114,3 21%	ND	ND	530,6 (10%)	ND	0	ND	ND
HDC31	10m	12100	5700 (47%)	2546,2 (44%)	2100 (37%)	1473,2 (25%)	328,4 (6%)	1320 (23%)	610,5 (11%)	228 (4%)	118,5 (19%)	456 (8%)	0	114 (2%)	324,9 57%
HDC32	4a	9975	4289 (43%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HDC33	6m	17770	2790 (15,7%)	1450,8 52%	1060,2 38%	585,9 21%	251,1 9%	334,8 12%	334,8 12%	55,8 2%	948,6 34%	195,3 7%	0	55,8 2%	1534,5 55%
HDC34	7m	9100	2730 (30%)	1965 (72%)	1501,5 (55%)	ND	ND	546 (20%)	ND	ND	15%	5%	0	ND	ND

		Leucocitos	Linf T	CD3	CD4	CD4Ra	CD4Ro	CD8	CD8Ra	CD8Ro	Linf B	NK	CDI	CD45+CD3+DR	
C1	16a	6150	2850 (46,3%)	2137,5 (75%)	1026 (36%)	18 (10%)	627 (22%)	997,5 (35%)	826,5 (29%)	427,5 (15%)	256,5 (9%)	399 (14%)	0	171 (6%)	
C2	15a	13280	1890 14,2%	1512 80%	774,9 41%	359,1 19%	359 19%	661,5 (35%)	529,2 (28%)	151,2 (8%)	264 (14%)	76 (4%)	0	94,5 (5%)	
C3	13a	ND	ND	81%	39%	19%	17%	36%	31%	9%	7%	11%	0	3%	
C4	11a	4950	2230 (45%)	1650 (74%)	1025,8 (46%)	780,5 (35%)	245,3 (11%)	423,7 (19%)	446 (20%)	111,5 (5%)	356,8 (16%)	223 (10%)	0	133,8 (6%)	
C5	8a	6700	1930 (29%)	1313 (68%)	682 (35%)	336,2 (17%)	201,7 (10%)	502,1 26%	285,1 14,7_%	115, 6%	285 14,7%	139,5 7,2%	0	96,5 5%	
C6	2a	9194	2530 27%	1821 72%	1062,6 42%	506 20%	430,1 17%	810 32%	506 20%	304 12%	455,4 18%	126,5 5%	0	152 6%	
C7	11a	6730	2690 (40%)	1909,9 (71%)	1129,8 (42%)	538 (20%)	484,2 (18%)	672,5 (25%)	618,7 (23%)	215,2 (8%)	430,4 (16%)	376,6 (14%)	0	134,5 (5%)	
C8	3a	8200	2500 30%	2050 82%	975 39%	480 19%	225 9%	675 27%	500 20%	300 12%	375 15%	----	0	125 5%	
C9	9a	5880	2470 (42%)	2025,4 (82%)	913,9 (37%)	592,8 (24%)	345,8 (14%)	839,8 (34%)	716,3 (29%)	247 (10%)	197,6 (8%)	247 (10%)	0	172,9 (7%)	
C10	7a	5540	2250 (40,6%)	1687,5 (75%)	1035 (46%)	382,5 (17%)	360 (16%)	585 (26%)	405 (18%)	202,5 (9%)	337,5 (15%)	202,5 (9%)	0	ND	1687,5 (75%)
C11	4a	4260	1390 (32,6%)	1084,2 (78%)	653,3 (47%)	417 (30%)	305,8 (22%)	347,5 (25%)	291,9 (21%)	139 (10%)	194,6 (14%)	83,4 (6%)	0	69,5 (5%)	1042,5 (75%)
C12	3a	7950	3520 (44,27%)	2569,6 (73%)	1865,6 (53%)	1513,6 (43%)	352 (10%)	633,6 (18%)	739,2 (21%)	140,8 (4%)	598,4 (17%)	316,8 (9%)	0	70,4 (2%)	2640 (75%)
C13	3a	8580	4310 (50,23%)	3275 (76%)	1896,4 (44%)	1379,2 (32%)	387,9 (9%)	1293 (30%)	1077,5 (25%)	172,4 (4%)	775,8 (18%)	258,6 (6%)	0	129,3 (3%)	2973,9 (69%)
C14	4a	7670	2320 (30,24%)	1577,6 (68%)	928 (40%)	672,8 (29%)	232 (10%)	580 (25%)	556,8 (24%)	116 (5%)	487,2 (21%)	208,8 (9%)	0	139,2 (6%)	1763,2 (76%)
C15	4a	5240	2520 (48%)	1839,6 (73%)	806,4 (32%)	504 (20%)	252 (10%)	680,4 (27%)	428,4 (17%)	252 (10%)	529,2 (21%)	151,2 (6%)	0	151,2 (6%)	1789,2 (71%)
C16	3a	7380	1780 (24,11%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

C17	3a	6920	2820 (40,7%)	2171,4 (77%)	1071,6 (38%)	592,2 (21%)	338,4 (12%)	902,4 (32%)	620,4 (22%)	197,4 (7%)	394,8 (14%)	253,8 (9%)	0	ND	1945,8 (69%)
C18	2a	10800	4860 45%	3645 75%	2187 45%	729 15%	438 9%	972 20%	729 15%	243 5%	729 15%	486 10%	0	291,6 6%	3304,8 68%
C19	11m	6490	3790 (58,39%)	2198,2 (58%)	1440,2 (38%)	985,4 (26%)	303,2 (8%)	644,3 (17%)	833,8 (22%)	113,7 (3%)	530,6 (14%)	985,4 (26%)	0	227,4 (6%)	2804,6 (74%)
C20	2a	9400	2790 (29,68%)	1729,8 62%	1199,7 43%	641,17 23%	418,5 15%	502,2 18%	390 14%	109,3 4%	446,4 16%	223 8%	0	111,6 4%	1953 70%

